



**Universidad Autónoma Metropolitana**  
*Unidad Iztapalapa*

**Université Claude Bernard Lyon 1**

## **EXTRACCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE QUITINA PARA LA PRODUCCIÓN DE QUITOSANOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN**

**(Extraction biotechnologique de la chitine pour la production de chitosane: caractérisation et application)**

### **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT  
(Arrêté du 7 août 2006 et arrêté du 6 janvier 2005)  
Spécialité "Matériaux Polymères et Composites"

**P R E S E N T A** (Présentée par) :

**M. en B. Neith Aracely Pacheco López.**

**Comité tutorial:**

**Directora de tesis:**

**Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto<sup>1</sup>**

Dr. Laurent David<sup>2</sup>

Dr. Stéphane Trombotto<sup>2</sup>

Dr. Gustavo Viniegra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa México.

<sup>2</sup>Ingénierie des Matériaux Polymères, UCB-Lyon 1 France.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O”

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en México D.F. bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONACyT proyecto No. 105628 y SAGARPA CONAPESCA. Asimismo agradezco a al programa de CONACyT PCP-México-Francia (NP) por la beca otorgada para realizar acciones de movilidad en la Universidad Claude Bernard Lyon 1, en el Laboratorio de Materiales Poliméricos y Biomateriales, en la ciudad de Lyon Francia, bajo la dirección del Dr. Laurent David.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

**M. en B. Neith Aracely Pacheco López.**

El día 19 de Abril del 2010

**Comité tutorial:**

**Directora de tesis:**

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Dr. Laurent David

Dr. Stéphane Trombotto

Dr. Gustavo Viniegra

**H. Jurado**

*Presidente:*

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

*Secretario:*

Dr. Miquel Gimeno seco

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

*Sinodales:*

Dr. Sebastien Fort

Professeur HDR, CNRS Université Joseph Fourier Grenoble France

Dr. Stéphane Trombotto

Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de matériaux polymères et des biomatériaux.

*Hay que tener sueños lo suficientemente grandes para no  
perderlos de vista mientras se persiguen*

*William Faulkner*

*A mis padres y a mis hermanos Estela, Adrian, Vero y Adrian*

# AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar por escrito el agradecimiento a todas esas personas que han colaborado de alguna manera para la realización de esta tesis.

Primero que nada agradezco a la Dra. Keiko Shirai por aceptarme como una de sus alumnas, por su confianza y apoyo en cada momento requerido, por los conocimientos transmitidos, por sus consejos y en especial por su apoyo.

Al Dr. Laurent David, por atender a mis dudas, por sus comentarios, sugerencias y consejos durante las estancias realizadas en el LMPB, pour l'esprit scientifique, pour sa disponibilité, son écoute et sa confiance.

Al Dr. Stéphane Trombotto por sus comentarios, sugerencias y apoyo durante las estancias realizadas en el LMPB, pour sa disponibilité, son soutien, son exemple et son aide dans l'expérimentation.

Al Dr. Miquel Jimeno y el Dr. Sebastien Fort por las sugerencias y comentarios en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biopolímeros Doctores Rocha, Carrasco, Alonso, Muñiz, De Santiago, Islas, a Mony por su confianza en mis conocimientos, Marco, Carmen, Laura, Gustavo y todos los demás, mil gracias por los momentos tan divertidos en el laboratorio, por sus consejos y sobre todo por su amistad.

A Ricardo Hernández y Gabriel Vigueras, por estar junto a mí desde el inicio de este proceso, por su apoyo, comprensión pero sobretodo amistad. Al los chicos del club de escalada Sergio Hernández, Dianis, Gabo.

Merci à mes amis et mes collègues du labo LMPB pour m'avoir encouragée, aidée et rendu plus joyeux mes séjours à Lyon, Cristalita, Milenita, Florianita, Florencita, Aurelita, Alice, Rocio, Ce-guinto, Kevincito, Julianito, Maher, Agnes, Jean-Mi, Sylvie, Denis, Ludovic. Mathieu. Aux amis en dehors du labo Gabriel Bidault et Pascal, qui m'ont donné plus qu'un endroit pour habiter une grande amitié.

A los chicos Mexicanos y no Mexicanos en Lyon, Marce, Steph, Yeri, Juan, Mónica, Fabrice, Noé, Gustavo que hicieron mis días en Lyon mucho mas divertidos.

A mi familia en especial a mis padres Estela y Adrian que sin su apoyo, ejemplo, confianza y amor nada de lo que soy sería posible, a mis hermanos Vero y Adrian que con su ejemplo, confianza, optimismo y alegría me hacen seguir adelante, a mi cuñado Felix, a mis abuelos (gracias abuelito Arturo por tu gran ejemplo), tios y primos, gracias a Lili y Alfredo por compartir tantos momentos al inicio del doctorado.

A Ulises García Cruz por su apoyo incondicional, por su confianza, pero sobre todo por su amor, Te amo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al programa PCP.

# Contenido

Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Introducción general .....	xxxi
CAPÍTULO UNO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1    Introducción .....	1
1.2    La quitina y el quitosano .....	2
1.2.1    Definición y estructura química .....	2
1.2.2    Propiedades .....	3
1.3    Fuentes de quitina y quitosano.....	15
1.3.1    Quitina en la naturaleza .....	15
1.3.2    Métodos de extracción de quitina.....	17
1.3.3    Métodos de obtención de quitosano .....	22
1.4    Fermentación Acido láctica.....	28
1.4.1    Bacterias lácticas .....	28
1.4.2    Condiciones de crecimiento.....	29
1.4.3    Fermentación en medio sólido .....	30
CAPITULO DOS: EFFECT OF TEMPERATURE ON CHITIN AND ASTAXANTHIN RECOVERIES FROM SHRIMP WASTE USING LACTIC ACID BACTERIA .....	33
Abstract .....	33
2.1    Introduction.....	34
2.2    Materials and methods.....	35
2.2.1    Materials .....	35
2.2.2    LAF conditions.....	35
2.2.3    Analyses of samples .....	36
2.2.4    Modeling the growth of LAB and acidification .....	37
2.2.5    Effect of temperature and TTA on D <sub>MIN</sub> % by RSM .....	38
2.2.6    Determination of free-astaxanthin by high performance liquid chromatography (HPLC) .....	39
2.2.7    Statistical analyses.....	40
2.3    Results and discussion .....	40
2.3.1    pH, TTA and acidification kinetics .....	40
2.3.2    D <sub>MIN</sub> %, D <sub>PROT</sub> % and C% in LAF products .....	41
2.3.3    Determination of LAB.....	44

2.3.4 Quantification of astaxanthin in the fermented shrimp wastes .....	45
2.4 Conclusions .....	47
CAPÍTULO TRES: CHITIN EXTRACTION AND CHARACTERIZATION FROM SHRIMP WASTE ( <i>Litopenaeus vanameii</i> ), CHEMICAL AND ENZYMATIC DEACETYLATION .....	49
3.1 Objectives .....	49
3.2 Introduction .....	50
3.3 Methodology .....	52
3.3.1 Materials .....	52
3.3.2 LAF procedure .....	53
3.3.3 Chemical preparation of chitin .....	53
3.3.4 Analyses of samples .....	54
3.3.5 Modeling the acidification process and growth of LAB .....	56
3.3.6 Chemical deacetylation of chitin and products purification .....	56
3.3.7 Physicochemical characterization .....	57
3.3.8 Production of enzymatic extract of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	57
3.3.9 Purification of enzymatic extract .....	57
3.3.10 Evaluation of partial CDAs in different chitins as substrates .....	58
3.4 Results and discussion .....	58
3.4.1 Mineral and protein elimination during LAF .....	58
3.4.2 Physico-chemical characterization .....	64
3.4.3 Chemical deacetylation of chitins .....	65
3.4.1 Effect in the $M_w$ and DD of resulted products with second FPT deacetylation, .....	67
3.4.2 Partial purification of chitin deacetylases enzymes (CDAs) from <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . .....	68
3.4.3 Determination of enzyme and substrate concentration for enzymatic deacetylation with partial purified chitin deacetylases of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . .....	68
3.4.4 Application of partial purified CDA's from <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> in different chitin substrates. ....	70
3.5 Conclusions .....	72
CAPITULO CUATRO: EVALUATION OF CHITOSANS AND <i>Pichia guilliermondii</i> AS GROWTH INHIBITORS OF <i>Penicillium digitatum</i> .....	73

Abstract .....	73
4.1 Introducción .....	74
4.2 Materials and methods .....	75
4.2.1 Materials .....	75
4.2.2 Chitin and chitosan characterization .....	75
4.2.3 Microorganisms .....	76
4.2.4 Determination of the minimum inhibitory .....	76
4.2.5 Scanning electron microscopy .....	77
4.2.6 Statistical analyses .....	78
4.3 Results and discussion .....	78
4.3.1 Minimum growth inhibitory concentrations (MIC) .....	79
4.3.2 Determination of the radial growth (RG) and the radial inhibition (RI%) of <i>P. digitatum</i> .....	80
4.3.3 Inhibition of spore germination (SGI) of <i>P. digitatum</i> .....	82
4.3.4 Determination of inhibition of <i>P. guillermondii</i> .....	84
4.4 Conclusion .....	86
CAPITULO CINCO: DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS .....	87
5.1 Discusión general .....	87
5.2 Conclusión .....	90
5.3 Perspectivas .....	91
REFERENCIAS .....	93
ANEXOS. ....	99
ARTICULOS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DE ESTA TESIS .....	124



## Lista de figuras

<b>Figura 1. 1</b>	Estructura primaria de la quitina y el quitosano	2
<b>Figura 1. 2</b>	Estructura cristalina de la $\alpha$ -quitina propuesta por Minke and Blackwel, (1978). proyección en los planos (bc) y (ab).	5
<b>Figura 1. 3</b>	Espectro de quitosano en $\text{rmn}^1\text{h}$ a 400 mhz en medio acidificado de acuerdo a Hirai <i>et al.</i> (1991).	12
<b>Figura 1. 4</b>	Espectro de $\text{RMN}^1\text{H}$ de quitina en $\text{DCI/D}_2\text{O}$ a 400mhz (Einbu <i>et al.</i> , 2008)	12
<b>Figura 1. 5</b>	Estructura microfibrilar del exoesqueleto de crustáceos de acuerdo a Rabea <i>et al.</i> (2005).	17
<b>Figura 1. 6</b>	Desacetilación de las unidades de glnac para obtención de quitosano, el agente desacetilante puede ser una base fuerte.	23
<b>Figura 1. 7</b>	Reacción de desacetilación enzimática descrita por Tsigos <i>et al.</i> (2000)	24
<b>Figura 1. 8</b>	Esquema generalizado de la fermentación de la glucosa en BAL.	30
<b>Figure 2. 1</b>	The kinetic parameters of acidification estimated by Gompertz model (ecuation. 2.1) and final pH values obtained in the liquid fraction after 144 h of laf of shrimp wastes at different temperatures.	40
<b>Figure 2. 2</b>	Three dimensional plot of $D_{\min}\%$ as a function of tta expressed as la ( $\text{mmol.g}^{-1}$ ) and temperature ( $^{\circ}\text{c}$ ) during laf of shrimp wastes.	42
<b>Figure 2. 3</b>	Deproteinization percentage determined in the solid fractions after 144h of laf of shrimp wastes at different temperatures.	43
<b>Figure 2. 4</b>	Effect of temperature on growth rate of lab in shrimp wastes: a) Arrhenius plot and b) Square root model.	45
<b>Figure 2. 5</b>	Free-astaxanthin content (-o-) and proportion of the mixture of 9 and 13-cis astaxanthin (■) and all trans-astaxanthin (□) isomers in the acetone extracts from the solid fractions of the laf at different operational temperatures.	47
<b>Figure 3. 1</b>	pH in liquor (○) and solids (●), lactic acid in liquor (□) and solids (■), and lactic acid bacteria growth (▲) in samples obtained during lactic acid fermentation of shrimp waste <i>litopenaues vanameii</i> during 144h.	59
<b>Figure 3. 2</b>	TTA expressed as mmol of lactic acid per g of silage (○), sucrose consumption expressed in $\text{mmol.g}^{-1}$ of silage (●) and demineralization pattern (□) during lactic acid fermentation at $35^{\circ}\text{c}$ .	61
<b>Figure 3. 3</b>	Protease activity in solid fractions from shrimp waste <i>Litopenaues vanameii</i> at ph 7 (○), ph 6 (■), ph 5 (●) and deproteinization pattern (□) during the 144h of fermentation a $35^{\circ}\text{c}$	62
<b>Figure 3. 4</b>	$\mu\text{g}$ of astaxantin in solids (●) and liquor (○) during the fermentation at $35^{\circ}\text{c}$ .	63
<b>Figure 3. 5</b>	Deacetylation degree and molecular weight determined during FTP deacetylation on chemical chitin (○) and biological chitin (●)	66

<b>Figure 3. 6</b>	Molecular weight (- ▲ -) and degree of deacetylation (-▲-) of the second deacetylation FPT process of biological chitin.	67
<b>Figure 3. 7</b>	Molecular weight and acetate production during deacetylation of reacetylated chitosan (da 60% ) at different enzyme concentrations at 45°C.	69
<b>Figure 3. 8</b>	Acetate production with different substrate concentration of reacetylated chitosan (DA 60%) at different reaction times.	71
<b>Figure 4. 1</b>	Spore germination of <i>Penicillium digitatum</i> in control médium (○), con pichia guillermundii (●), with added (a) LB-I chitosan and (b) LB-II chitosan at concentrations of 1,2 g.l <sup>-1</sup> (Δ) and 2,5 g.l <sup>-1</sup> (□) of chitosan or in combination with yeast 1,2 g.l <sup>-1</sup> (▲), 2,5 g.l <sup>-1</sup> (■).	83
<b>Figure 4. 2</b>	<i>P. guillermundii</i> growth determined at several LB-I chitosan (107 x 10 <sup>3</sup> g.mol <sup>-1</sup> ) concentrations (□) or in presence of mould (■) after 96h of incubation.	84
<b>Figure 4. 3</b>	<i>P. guillermundii</i> growth determined at several LB-II chitosan (400 x 10 <sup>3</sup> g.mol <sup>-1</sup> ) concentrations (□) or in presence of mould (■) after 96h of incubation.	85
<b>Figure 4. 4</b>	Scanning electron micrographis of <i>P. guillermundii</i> growth in nyda after 96h of incubation (magnification x 1000): controls (a) yeast and (c) interacting with <i>P. digitatum</i> chitosan (107 x 10 <sup>3</sup> g.mol <sup>-1</sup> ) at concentration of 1,2 g.l <sup>-1</sup> : (b) yests and (d) interacting with <i>P. digitatum</i> . CH = chitosan, H = hypha, Y = yeast and BY = budding yeast.	86

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.1</b>	Parámetros de malla de la quitina y quitosano.....	4
<b>Tabla 1.2</b>	Propiedades generales de la quitina y el quitosano.....	6
<b>Tabla 1.3</b>	Concentración mínima inhibitoria del quitosano para diferentes bacterias y hongos.....	10
<b>Tabla 1.4</b>	Parámetros de Mark-Houwink Sakurada para la deteminación del peso molecular de la quitina y el quitosano .....	13
<b>Tabla 1.5</b>	Composición química proximal en porcentaje (%) en base seca de del exoesqueleto de crustáceos.....	16
<b>Tabla 1.6</b>	Principales microorganismos y su eficiencia en la extracción biológica de quitina .....	21
<b>Tabla 1.7</b>	Principales características de las quitin desacetilasas más estudiadas. ....	25
<b>Tabla 1.8</b>	Modificaciones en sustratos quitinolíticos para la favorización en la desacetilación enzimática.....	28
<b>Tabla 2.1</b>	Estimated coefficients, standard errors, t- and p- values for the model according to the model .....	41
<b>Tabla 2.2</b>	Proximate composition of of non fermented shrimp wastes (raw) and la fermented after 144 h at several temperatures. ....	44
<b>Tabla 3.1</b>	Protein and ash content in dry basis, intrinsic viscosity, molecular weight ( $M_w$ ) and acetilatyon degree (DA) from samples obtained during fermentation of shrimp waste <i>Litopenaeus vanameii</i> and BIO, chemical and commercial chitines.....	65
<b>Tabla 3.2</b>	Partial purification of chitin deacetylase from <i>Coletotrichum gloeosporioides</i> . ....	68
<b>Tabla 3.3</b>	Kinetic parameters of acetate production using different substrate concentrations of reacetlylated chitosan with da of 60%.....	70
<b>Tabla 3.4</b>	Molecular weight and degree of acetylation of chitin samples before and after partial purified enzyme evaluation.....	71
<b>Tabla 4.1</b>	Molecular weight ( $M_w$ ) of the chitins obtained by fermentation and further used for preparation of chitosans .....	76
<b>Tabla 4.2</b>	Degree of acetylation (DA) molecular weight ( $M_w$ ) and minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosans determined in NYD agar for yeasts and moulds at 48 h and 30 °c .....	79
<b>Tabla 4.3</b>	Percentage of radial inhibition (RI%) and kinetics parameters of radial growth of <i>Penicillium digitatum</i> estimated with logistic model at different concentrations of chitosan with and without inoculation of <i>Pichia guilliermondii</i> .....	81
<b>Tabla 4.4</b>	Percentage of spore germination inhibition (SGI%) and kinetic parameters of germination of <i>p. digitatum</i> estimated by logistic model and determined at different concentrations of chitosans with and without inoculation of <i>P. guilliermondii</i> .....	83

## Nomenclatura

Símbolo	Definición
$A_w$	Water Activity
BIO-C	Biological chitin
°C	Celsius degrees
CDA	Chitin deacetylases enzymes
CHC	Chemical chitin
CHS	Chitin Sponge
CHS-P	Chitin sponge precipitated
CFU	Colony formed units
DA	Acetylation degree (%)
DD	Degree of acetylation
$D_{ap}$	Crystallites size
$D_{MIN}$	Demineralization
$D_{PROT}$	Deproteinization
DMAc	Dimethyl acetamide
$E_A$	Activation energy
EMB	Eosin Methylen Blue agar
FPT	Freeze- Pump Out – Thaw Cycles deacetylation
GPC	Gel permeation chromatography
$^1H$ NMR	Proton nuclear magnetic resonance
HCH	Hydrolyzed chitin
HPLC	High pressure liquid chromatography
$I_{CR}$	Crystalline Index
°K	Kelvin degrees
$k$	Acidification rates, bacterial growth rates and acetate production rates
$k_R$	Radial rates
$K_M$	Concentration of substrate that leads to half-maximal velocity
LA	Lactic acid
LAF	Lactic acid fermentation
LAB	Lactic acid bacteria
LB	Lactic bacteria

Símbolo	Definición
LB-I	Chitosan obtained from biological chitin with at room temperature homogeneous deacetylation
LB-II	Chitosan obtained from biological chitin by freeze-pump-out-thaw-cycles heterogeneous deacetylation
$M_w$	Molecular weight
MIC	Minimum inhibitory concentration
MiWe CH	Microwaved chitin
MRS	Man Rogosa and Sharpe agar
NYD	Nutrient Yeast Dextrose Culture medium
NYDA	Nutrient Yeast Dextrose Agar Culture medium
$\eta$	Intrinsic viscosity
PDA	Potato Dextrose Agar Medium
$P_{max}$	Maximum lactic acid production, bacterial growth and acetate production
RG	Radial growth
$RG_{max}$	Maximal radial growth(mm)
RI	Radial inhibition
$R_I$	Radial growth in the treatment
$R_C$	Radial growth in control
RSM	Response surface methodology
$RG_c$	Radial growth in the control (mm)
$R_I$	Radial inhibition (mm) (%)
$S_I$	Spore germination in treatment
SG	Spore germination (%)
SGI	Spore germination inhibition
$SG_C$	Spore germination in control
$SG_{max}$	Maximal spore germination
TTA	Total titrable acidity
$T_{max}$	Maximal growth temperature
$T_{min}$	Minimal growth temperature
$V_{max}$	Limiting velocity as substrate concentrations get very large

## Ecuaciones

Determinación del grado de acetilación (Ecuación 1).

$$DA(\%) = \frac{\frac{1}{3}I_{CH_3}}{\frac{1}{6}H_2 - H_6} \times 100 \quad (1)$$

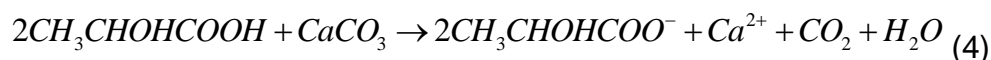
Determinación de las fracciones acetiladas en función de los protones del extremo reductor (Ecuación 2).

$$F_A = \frac{(I_{\alpha H1A} + I_{(\beta H1A+H1D)} + I_{H1A}) - I_{H2D}}{(I_{\alpha H1A} + I_{(\beta H1A+H1D)} + I_{H1A})} \quad (2)$$

Determinación de la viscosidad intrínseca mediante la ecuación de Mark-Houwink sakurata (Ecuación 3).

$$\eta = KM_w^a \quad (3)$$

Reacción de solubilización del carbonato de calcio presente en el desecho de camarón mediante el ácido láctico (Ecuación 4).



Determinación de los porcentajes de desmineralización y desproteínización (Ecuación 5).

$$Y(\%) = \frac{[(X_0 \times S_0) - (X_R \times S_R)]}{X_0 \times S_0} \times 100 \quad (5)$$

Modelo de Gompertz para la determinación de parámetros cinéticos en producción de ácido láctico, crecimiento microbiano y producción de acetato (Ecuación 6).

$$y(t) = a \exp(-b \exp(-kt)) \quad (6)$$

Ecuación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación (Ecuación 7).

$$k = Ae^{-E_A/RT} \quad (7)$$

Modelo de la raíz cuadrada propuesto por Ratkowsky para la determinación de temperaturas mínimas y máximas de crecimiento microbiano (Ecuación 8).

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \left\{ 1 - e \left[ c(T - T_{\max}) \right] \right\} \quad (8)$$

Determinación de la codificación de variables para el diseño de experimentos (Ecuación 9).

$$X = \frac{x - \left[ \frac{(x_{\max} + x_{\min})}{2} \right]}{\frac{(x_{\max} - x_{\min})}{2}} \quad (9)$$

Ecuación de segundo grado obtenida como modelo que proporciona porcentajes de desmineralización en función de la temperatura y la acidez (Ecuación 10).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j<i} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (10)$$

Determinación del índice de cristalinidad de la quitina (Ecuación 11).

$$I_{CR} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100 \quad (11)$$

Determinación del tamaño de cristales de la quitina (Ecuación 12).

$$D_{ap[110]} = \frac{K_{\lambda}}{\beta_0 \cos \theta} \quad (12)$$

Efecto del quitosano sobre la inhibición radial e inhibición de esporas de *Penicillium digitatum* (Ecuaciones 13 y 14).

$$I(\%) = \left[ \frac{c-i}{c} \right] \times 100 \quad (13)$$

$$y = \frac{a}{\left[ 1 + \left( \frac{a-b}{b} \right) e^{-cx} \right]} \quad (14)$$

## Resumen

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza que junto con el quitosano, su principal derivado, presentan diversas aplicaciones. Los desechos de camarón representan una fuente de quitina que permite la valorización de un compuesto que por lo general es responsable de un problema ambiental. La quitina y el quitosano son producidos industrialmente mediante proceso termo químico. Sin embargo estos métodos generan desechos corrosivos, gasto de energía y agua y la producción de biopolímeros con cierto grado de depolimerización.

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio de factores que afectan los procesos de desmineralización, desproteínización y desacetilación de desperdicios de camarón para obtención de quitina y quitosano mediante bacterias lácticas y enzimas, la caracterización de los productos obtenidos y su aplicación como agente fungistáticos.

El estudio de la temperatura de fermentación de los desechos de camarón permitió determinar condiciones óptimas para la remoción de proteínas y minerales (Temperatura entre 30 - 40°C). El modelo polinomial de segundo orden obtenido, proporcionó una herramienta para la predicción de la desmineralización en función de la temperatura y la acidez y la determinación de valores mínimos y máximos de crecimiento de las bacterias lácticas.

Las cinéticas de desmineralización y desproteínización durante la fermentación de desechos de camarón *Litopenaeus vanameii*, mostraron la posibilidad de acortar el tiempo de fermentación al obtener más del 90 % de desmineralización y desproteínización a las 96h del proceso. La caracterización estructural de los productos obtenidos, indicó que el proceso biológico permite la conservación de pesos moleculares elevados. La determinación de parámetros estructurales durante la desacetilación química de quitinas biológicas indicó la conservación del peso molecular en los productos de desacetilación. Características útiles para aplicaciones posteriores.



La producción de enzimas chitin desacetiladas, las cuales catalizan la hidrólisis de N- desacetilación de la quitina, resultado ser una alternativa al método químico de reacción. El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* mostró la capacidad de producir chitin desacetilasas, que al ser parcialmente purificadas permitieron la determinación de condiciones de desacetilación. La aplicación de las enzimas parcialmente purificadas en quitinas y quitinas modificadas química y físicamente mostró hasta un 20% de disminución en el grado de acetilación de los biopolímeros con ligera pérdida en el peso molecular.

Por último, la determinaciones *in vitro* del efecto de quitosanos con diferentes pesos moleculares y grados de acetilación, mostraron que el quitosano de peso molecular medio ( $400 \text{ g.mol}^{-1}$ ) inhibió al hongo *P. digitatum* durante la etapa de germinación de esporas, y que en combinación con un agente de biocontrol como la levadura (*Pichia guilliermondii*) la inhibición se observa durante la etapa de crecimiento radial.

La evaluación de temperatura y determinación de cinéticas de desmineralización y desproteinización durante el proceso de fermentación, permitieron la optimización del proceso. Las quitinas biológicas desacetiladas químicamente mostraron la conservación del peso molecular y el índice de cristalinidad. El método enzimático de desacetilación mostró disminución del grado de acetilación con menor reducción en el peso molecular al comparar con quitinas obtenidas por métodos químicos. El grado de acetilación y peso molecular de los quitosanos obtenidos por métodos químicos mostraron influenciar en la actividad antimicrobiana del mismo.

## ABSTRACT

Chitin is one of the most abundant biopolymers on earth together and with the chitosan, its main derivative, they have shown several applications. Shrimp wastes represent a source of chitin that allows recovery of this compound and this process resolves an environmental problem. Chitin and chitosan are produced industrially by a thermo chemical process. However, these methods generate corrosive side products, high energy and water consumption and the production of biopolymers with a high degree of depolymerization.

The main objective of this work was the study of the factors that affect the demineralization, deproteinization and deacetylation process of shrimp waste for chitin and chitosan production by the use of lactic bacteria and enzymes, the characterization of the products obtained and their application as a fungistatic agent.

The study of the temperatures in the fermentation allowed the determination of the optimal conditions for the removal of proteins and minerals (temperature between 30 - 40 ° C). The polynomial model of second order obtained, provided a tool for the prediction of demineralization as a function of temperature and acidity. The growth of lactic acid bacteria at different temperatures enabled the determination of minimum and maximum growth temperatures.

The kinetics of demineralization and deproteinization during fermentation of shrimp waste *Litopenaeus vanameii* have shown the possibility of diminish the fermentation time to attain above 90% of demineralization and deproteinization after 96h. Structural characterization of the products obtained, indicated that the biological process allows the preservation of high molecular weight of the macromolecule. The determination of structural parameters during the chemical desacetilación of chitin, showed the conservation of the macromolecular structure of biological products after deacetylation. These are important features for further applications.

Chitin deacetylases, proved to be an alternative to the chemical deacetylation method. The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* showed the ability to produce chitin deacetylases that after partially purification allowed the determination of

optimum deacetylation conditions. The application of enzymes in partially purified chitin and chemically and physically modified chitins showed a decrease up to 20% in the degree of acetylation of the biopolymers, with a slight loss in molecular weight.

Finally, *in vitro* determinations of the effect of chitosan with different molecular weights and degrees of acetylation showed that an average molecular weight chitosan ( $400 \text{ g.mol}^{-1}$ ), inhibited the fungus *P. digitatum* during the stage of spore germination. The chitosan in combination with a biocontrol agent such as yeast (*Pichia guilliermondii*) showed an inhibition in the radial growth phase.

The evaluation of temperature and the kinetics of demineralization and deproteinization during the fermentation process, allowed the optimization of the process. Biological chemically deacetylated chitins, showed conservation in the molecular weight and crystallinity index. The enzymatic method indicated a decreased on the deacetylation degree, with a low reduction in molecular weight compared with chemical deacetylated chitins. The degree of acetylation and molecular weight of chitosans influence the antimicrobial activity.

## Résumé français

### Introduction générale

Les polymères jouent un rôle important dans la nature et dans de nombreux secteurs industriels. Parmi les polymères naturels, on retrouve par exemple ceux qui sont transporteurs de l'information biologique et ceux qui participent à la structure et aux propriétés des matériaux que l'on trouve dans la biomasse. Par ailleurs, les polymères synthétiques ont été produits et utilisés dans de nombreuses applications. Cependant, ils posent des problèmes environnementaux, car la plupart de ces matériaux ne sont pas biodégradables. Ils sont issus de ressources non renouvelables et, dans certains cas, leur synthèse et leur présence dans les écosystèmes génèrent des composés toxiques.

Plusieurs méthodes ont été développées pour obtenir des polymères naturels (biopolymères) en combinant leurs avantages environnementaux et leur potentiel industriel. Certains de ces matériaux pourraient remplacer les polymères synthétiques existants ou ouvrir de nouvelles applications spécifiques. La chitine est l'un des biopolymères les plus abondants dans la nature. Elle constitue l'élément structural des exosquelettes des arthropodes (crustacés, insectes) des endosquelettes des céphalopodes (calmar, seiche) et de la paroi cellulaire de certains champignons. Les matériaux à base de chitine et son principal dérivé, le chitosane, possèdent d'importantes propriétés antimicrobiennes, émulsifiantes, etc. Ils sont utilisés avec succès dans des domaines aussi divers que la pharmacie, la médecine, l'industrie alimentaire, le traitement des eaux usées et l'agriculture, entre autres.

Au cours des dernières décennies, la production mondiale de crevettes a augmenté, le Mexique étant l'un des principaux producteurs au niveau mondial. Bien que l'industrialisation et la commercialisation de ce crustacé génèrent des ressources financières importantes dans ce pays, les déchets produits après l'extraction de la partie comestible sont responsables d'un impact environnemental négatif. Les carapaces des crevettes, contenant entre 13 et 40% de chitine, représenterait une source de matière première importante pour la production de ce polymère naturel. La valorisation de ces déchets devient donc une solution aux problèmes environnementaux générés par la consommation de crevettes.

Dans les exosquelettes de crustacés, la chitine forme une structure organisée associée à des protéines, des minéraux et des lipides. Jusqu'à présent, la chitine est extraite industriellement par des procédés chimiques successifs de déprotéinisation en solution alcaline, de déminéralisation par solubilisation de minéraux en milieu fortement acide et de blanchiment. Malgré de nombreuses avancées dans les méthodes de production chimique de la chitine et du chitosane, l'utilisation de solutions concentrées d'acide et de base alcaline continue à générer de grandes quantités d'eau usée. Ces solutions ont également des effets sur la masse molaire des biopolymères et par conséquent sur leurs applications. De plus, ces procédés chimiques rendent difficile la valorisation des sous-produits tels que les hydrolysats de protéines, les sels de calcium et les pigments.

Ces dernières années, diverses méthodes biotechnologiques ont été proposées comme une alternative aux méthodes chimiques d'extraction de la chitine et de production du chitosane. La fermentation lactique est un procédé prometteur pour l'extraction de la chitine, car la production d'acide lactique permet non seulement la préservation des déchets, mais aussi la solubilisation des minéraux et l'activation des enzymes endogènes capables de déprotéiniser les déchets. D'autre part, l'application de procédures non agressives favorise la récupération des produits secondaires en augmentant la faisabilité du procédé. L'utilisation d'enzymes dans la production de chitosane par désacétylation de la chitine est aussi une alternative à l'utilisation des bases alcalines concentrées. Elle permettrait ainsi de limiter la production d'effluents toxiques et la dépolymérisation du produit.

Divers facteurs comme la température et le pH peuvent affecter le développement des microorganismes dans le procédé de fermentation, et par conséquent influencer la déminéralisation, la déprotéinisation et l'activité des enzymes endogènes de la crevette sur les complexes chitine-protéines-minéraux. La méthode biotechnologique d'extraction de la chitine pourrait limiter la dépolymérisation du produit. Une utilisation réduite de produits chimiques devrait favoriser la préservation des masses molaires et la production de biopolymères aux caractéristiques différentes.

L'objectif principal de ce travail est de développer un procédé biotechnologique d'extraction de la chitine à partir de carapaces de crustacés à l'aide de bactéries lactiques et d'enzymes. A cette fin, on cherchera notamment à étudier les facteurs influençant les réactions de déminéralisation ( $D_{\text{MIN}}$ ), de déprotéinisation ( $D_{\text{PROT}}$ ) et de

désacétylation sur les caractéristiques physico-chimiques des produits obtenus. Ces caractéristiques concerneront en particulier les masses molaires moyennes en poids ( $M_w$ ), le degré d'acétylation (DA) et le taux de cristallinité ( $I_{CR}$ ). On s'intéressera également aux applications potentielles des chitosanes ainsi obtenus, notamment comme agent fongistatique.

Selon les objectifs proposés, les résultats de ce travail sont présentés comme suit:

**Le premier chapitre** donne une définition de la chitine et du chitosane d'un point de vue de leurs structures chimiques, leurs sources d'obtention et les méthodes d'extraction et de production. Les techniques de caractérisation de ces deux biopolymères ainsi que leurs principales applications potentielles seront également développées.

**Le chapitre 2** discute de l'effet de la température sur la fermentation lactique (LAF) d'un mélange de résidus de crevettes comme méthode biotechnologique d'extraction de la chitine et du pigment astaxanthine. Nous analysons les valeurs de l'acidification pendant la fermentation, la déprotéinisation, la déminéralisation et la concentration de l'astaxanthine dans les carapaces après la fermentation. A partir de la méthodologie de surface de réponse, nous avons obtenu une température optimale pour la déminéralisation et un modèle polynomial de deuxième ordre qui modélise l'influence de l'acidité et la température sur la déminéralisation des déchets. L'énergie d'activation et les valeurs cardinales de température des bactéries lactiques lors de la fermentation ont été déterminées.

**Le chapitre 3** présente l'étude de l'effet de la taille des particules et des espèces de crevettes dans l'extraction de la chitine et l'astaxanthine à partir de déchets de crevettes « *litopenaeus vanameii* ». Cette extraction par la fermentation acide lactique est réalisée en utilisant les meilleures conditions de fermentation obtenue dans le chapitre 2. Nous présentons ici l'analyse du comportement de déminéralisation et déprotéinisation pendant la fermentation. Une partie importante de ce chapitre se réfère à la caractérisation des masses molaires et des degrés d'acétylation. Nous comparons également des échantillons de chitine obtenus par voie biotechnologique avec ceux obtenus par voie chimique.

La deuxième partie du chapitre 3 traite de la désacétylation par des méthodes chimiques FPT (Freeze-Pump-Thaw) de la chitine obtenus par voie

biotechnologique. Ces données sont comparées avec celles obtenus lors de la désacétylation de la chitine extraite par voie chimique.

Pour finir le chapitre 3 évalue la production et purification partielle des enzymes de type désacétylases de chitine produites à partir du champignon *Colletotrichum gloeosporioides*, pour leur application avec différents substrats de chitine.

Au chapitre 4, nous étudions l'activité antimicrobienne de chitosanes obtenus à partir de la chitine biologique, sur la croissance de *Penicillium digitatum*, l'un des principaux champignons qui décomposent les fruits, au stade de la germination des spores et la croissance radiale. Nous étudions également l'association de ces chitosanes avec la levure *P. guilliermondii* utilisée comme agent de lutte biologique.

Enfin, dans le chapitre 5, nous ouvrons une discussion générale sur les résultats obtenus pendant ce travail, pour terminer avec une conclusion et les perspectives de celui-ci.

Voici un aperçu de chaque chapitre de cette thèse :

## CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## **CHAPITRE 2: EFFET DE LA TEMPERATURE DE FERMENTATION SUR LA PRODUCTION DE CHITINE ET D'ASTAXANTHINE A PARTIR DE DECHETS DE CREVETTE EN UTILISANT DES BACTERIES LACTIQUES**

Chapitre publié dans le journal Bioresource Technology (2009) 100:2849-2854.

Dans ce chapitre, nous avons étudié la température de fermentation lactique des déchets de crevettes. Les taux de déminéralisation et de déprotéinisation ont été déterminés: ils s'avèrent être des paramètres importants pour le suivi de l'extraction. La déminéralisation est reliée au processus d'acidification en utilisant la méthodologie de modélisation de réponse par l'équation de surface. Nous avons également évalué l'effet sur l'obtention d'astaxanthine et sur le comportement de bactéries lactiques.

L'extraction de la chitine et de l'astaxanthine par la fermentation lactique, a été réalisée dans des réacteurs à colonnes à 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 45°C. La méthodologie de surface de réponse a montré que les fermentations réalisées dans la gamme de température de 27 à 36°C avec de l'acide lactique supérieure à 0,319

mmol/g conduisent à la déminéralisation la plus importante. Les déprotéinisations maximales ont été atteintes entre 30 à 40°C. L'extraction de l'astaxanthine libre ne présente pas de variations significatives entre 20 et 35°C. Les taux de croissance de *Lactobacillus plantarum* ont été estimés dans la gamme de 15 à 45°C et analysés par les modèles d'Arrhenius et de Ratkowsky. Les valeurs extrêmes ont été 4 et 52°C, respectivement pour les températures minimales et maximales avec une énergie d'activation de 43 J.mol<sup>-1</sup>. Cette partie du travail nous a permis de déterminer la température optimale de fermentation afin d'obtenir les plus importants taux de déminéralisation et déprotéinisation. Avec le modèle obtenu, il est ainsi possible de prédire le taux de déminéralisation en fonction de la quantité d'acide lactique produit et la température.

### **CHAPITRE 3: EXTRACTION DE CHITINE À PARTIR DES DECHETS DES CREVETTES (*Litopenaeus vanameii*), CARACTERISATION STRUCTURALE et DESACETYLATION PAR VOIE CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE**

Dans ce chapitre, la déminéralisation, la déprotéinisation et la caractérisation des déchets au cours de la fermentation, ont été considérées comme des paramètres importants de la fermentation lactique pour une utilisation en tant que processus biologique d'extraction de la chitine.

La chitine a été extraite à partir de déchets de crevettes de l'espèce *Litopenaeus vanameii* par fermentation d'acide lactique (LAF) dans un réacteur à colonnes. La constante de vitesse d'acidification ( $k$ ) et la concentration maximale d'acide lactique ( $P_{\max}$ ) ont été estimées dans la fraction solide (0,036 h<sup>-1</sup> et 0.42mmol.g<sup>-1</sup>) et la fraction liquide (0,056 h<sup>-1</sup> et 0.78mmol.g<sup>-1</sup>). L'activité enzymatique de protéase a montré une activité importante dans la fraction solide à partir de 24h pour un pH compris entre 6 et 7. Les maxima de déminéralisation et déprotéinisation, 92% et 94% respectivement, ont été atteints après 96h avec un rendement brut en chitine de 45%. Une concentration de 2400 µg d'astaxanthine par gramme d'ensilage a été obtenue. La chitine brute obtenue après fermentation a été complètement purifiée par un procédé chimique avec de très faibles concentrations d'acides et bases, (NaOH 0.4M, HCl 0.5) à température ambiante et de courte durée, pour obtenir des chitines purifiées avec des valeurs en protéines et en minéraux dans les réglementations commerciales. Le degré d'acétylation (DA), la masse molaire ( $M_w$ ), le taux de cristallinité ( $I_{CR}$ ) et la taille apparente de cristallites ( $D_{ap}$ ) ont été déterminés



dans les échantillons obtenus au cours de la fermentation et comparés à ceux obtenus par voie complètement chimique. La chitine BIO a montré une masse molaire ( $1200\text{g.mol}^{-1}$ ) et un  $I_{CR}$  (86%) supérieurs à ceux observés pour les chitines produites par voie complètement chimique et commerciale. Le DA (94%) ne présente pas de différences significatives entre les autres échantillons. La fermentation lactique de déchets de crevettes s'est montrée être une méthode biologique efficace pour l'extraction de la chitine et de l'astaxanthine qui produit un biopolymère avec des caractéristiques prometteuses.

La deuxième partie de ce chapitre traite de la désacétylation chimique hétérogène (FPT), en utilisant la chitine biologique et sa comparaison par rapport à une chitine obtenue par voie chimique pour des applications ultérieures.

En raison de l'intérêt croissant dans la recherche de nouvelles méthodes de désacétylation de la chitine, la fin de ce chapitre se concentre sur l'étude de l'obtention et la purification des désacétylases de chitine à partir du champignon *Colletotrichum gloeosporioides*. Les concentrations en enzyme et substrat, ainsi que le temps de réaction ont été estimés en utilisant un chitosane reacylé avec un degré d'acétylation de 60%, et une masse molaire de  $450 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ . La désacétylation des chitines hydrolysées a permis d'abaisser le degré d'acétylation jusqu'à 25%. L'utilisation des enzymes type désacétylases de chitine du champignon *Colletotrichum gloeosporioides* s'avère une méthode alternative à la désacétylation chimique pour des chitines de faibles masses molaires.

**CHAPITRE 4: EVALUATION DE CHITOSANES ET *Pichia guilliermondii* COMME INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DE *Penicillium digitatum***  
Chapitre publié dans: International Journal of Biological Macromolecules (2008) 43:20-26

L'objectif de ce chapitre a été d'étudier *in vitro* l'effet du DA et de la masse molaire  $M_w$  de chitosanes sur la croissance de *P. digitatum* en association avec la levure *P. guilliermondii* comme agent de biocontrôle.

Les chitosanes utilisés ont été obtenus par désacétylation homogène à température ambiante (RTHD) et désacétylation hétérogène (FPT) à partir de chitines extraites par le procédé de fermentation. Un chitosane commercial a été aussi désacétylé par trois cycles FPT. Les chitosanes et la levure *Pichia guilliermondii* ont été étudiés sur

la croissance de *Penicillium digitatum*. Les chitosanes de masses molaires moyennes en poids comprises entre 300 et 500 x 10<sup>3</sup> g.mol<sup>-1</sup> ont affiché une plus grande activité inhibitrice contre la levure que le biopolymère de plus faible masse molaire (107 x 10<sup>3</sup> g.mol<sup>-1</sup>). Les chitosanes de faibles degrés d'acétylation (10 %) ont montré un effet inhibiteur contre les levures. Par conséquent, un chitosane avec une faible masse molaire et un DA élevé a été sélectionné pour être utilisé contre les champignons, combiné avec les levures. Les comportements biopolymère et les levures ont présenté un effet additif, puisque le chitosane a été efficace pour retarder la germination des spores, tandis que la levure a montré une diminution de la croissance apicale du champignon.

## Discussion générale

L'étude concernant l'effet de la température sur la fermentation lactique d'un mélange de résidus de crevettes pour l'extraction de la chitine décrite au chapitre 2, a montré que les températures de fermentation entre 30 et 40°C favorisent l'acidification du milieu. Les taux les plus élevés de déminéralisation ont été trouvés entre 27 et 36°C avec la production d'acide lactique supérieure à 0.319mmol/g. La plus forte croissance de bactéries lactiques et les taux de déprotéinisation les plus élevés ont été observés entre 30 et 45°C. Enfin, l'extraction maximale de l'astaxanthine libre a été obtenue entre 20 et 30°C. Les résultats expérimentaux de déminéralisation ont permis d'ajuster un modèle polynomial de deuxième ordre qui décrit la déminéralisation en fonction de la température et l'acidité totale titrable (TTA). Les résultats de déprotéinisation ont indiqué que l'élimination de protéines a été réalisée par les protéases de *L. plantarum* (Mathieus *et al.*, 2004) et les enzymes endogènes de la crevette (Oh *et al.*, 2000, Gordon, 2005). Les taux de déminéralisations et déprotéinisations obtenues, supérieures à 80%, sans addition d'acides organiques et relativement plus élevés que les rendements rapportés dans la littérature (Rao *et al.*, 2000; Brask, Cira *et al.*, 2002), suggèrent l'influence du diamètre de pore (4mm) du filtre qui sépare les deux fractions dans le réacteur, permettant une meilleure élimination des minéraux et des protéines. L'énergie d'activation pour la fermentation lactique (BAL) obtenue avec le modèle d'Arrhenius était 43,38 J.mol<sup>-1</sup>, les valeurs de la température dans les déchets déterminées par le modèle de Ratkowsky étaient  $T_{\max} = 324,85 \text{ K} + 1.37 (51.69^{\circ}\text{C})$  et  $T_{\min} = 277,1 \text{ K} + 2,52 (3,94^{\circ}\text{C})$ , similaires à ceux rapportés par Zwietering *et al.*, 1994.

Dans le chapitre 3, les cinétiques d'acidification, de déminéralisation, de déprotéinisation et de croissance microbienne au cours de la fermentation des résidus de crevettes « *litopenaeus vanameii* » avec une taille de particule de 1 mm, ont montré la possibilité de baisser le temps de fermentation. Une acidification plus élevée que ceux obtenus sur celle obtenue sur le mélange des déchets précédent (chapitre 2) ou que celle décrite dans des travaux précédents (Cira *et al.*, 2002) a été observée. L'activité protéolytique maximale est atteinte au cours des premières 48 h, étape dans laquelle les bactéries lactiques ont atteint la phase stationnaire, ce qui pourrait être lié à la production d'enzymes de *L. plantarum* nécessaires pour hydrolyser les protéines et favoriser la déprotéinisation. La détermination des taux de déminéralisation et déprotéinisation au cours de la fermentation a montré que le temps minimum requis pour obtenir le maximum de déminéralisation et déprotéinisation a été de 96 h. Des taux de déminéralisation et déprotéinisation supérieurs à 90% suggèrent l'effet de la taille des particules des déchets, ce qui a favorisé la solubilisation des minéraux et de la disponibilité du substrat en augmentant la surface de contact. Ceci favorise également la libération de l'astaxanthine, où les niveaux étaient élevés à 2400 µg, largement supérieurs à ceux publiés précédemment (Gimeno *et al.*, 2007). Après avoir enlevé les protéines et les minéraux résiduels de la chitine obtenue par fermentation avec l'aide d'un traitement chimique mineur, les échantillons ont été caractérisés. Nous avons mis en évidence la préservation de la masse molaire, le degré d'acétylation et le taux de cristallinité, avec des valeurs supérieures à celles obtenues par des méthodes totalement chimiques.

La caractérisation des chitines partiellement désacétylés et de chitosanes obtenus à partir de chitines extraites biologiquement dans le chapitre 4, a montré des valeurs de  $M_W$  et de  $I_{CR}$  plus élevées que celles obtenues à partir de chitine extraite chimiquement, ce qui peut être expliqué en raison du  $I_{CR}$  initial de 84% pour la chitine biologique (BC). La préservation des structures de la chitine dans des échantillons avec un DA de 40%, suggère que la désacétylation est réalisée en blocs, où la partie amorphe de l'échantillon est désacétylé de sorte que l'échantillon reste partiellement soluble dans des solutions acides

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des chitosanes obtenus à partir de la chitine biologique et avec des masses molaires différentes, seule ou en combinaison avec

un levure (*pichia guilliermondii*) a été étudiée dans le chapitre 5. Les résultats ont montré que le procédé d'obtention du chitosane a un effet sur les propriétés du produit final. Le procédé de désacétylation homogène a produit un DA de 34% tout en réduisant la masse molaire par rapport à la désacétylation hétérogène (DA 40%), conformément aux travaux antérieurs de Nemtsev *et al.*, (2002). L'analyse des concentrations d'inhibition minimales de chitosan testé contre *Penicillium digitatum* et *Pichi guilliermondii* a indiqué qu'un faible DA augmente l'activité antimicrobienne contre les levures et une masse molaire faible contre le champignon. Le chitosane avec de masse molaire  $107 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  et de DA 34% appelé LB-I, et le chitosane de masse molaire  $400 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  et de DA 40% appelé LB-II utilisés dans les expériences d'inhibition de la germination des spores et croissance radiale de *P. digitatum*, ont montré une inhibition de 100% au cours des premières 48h lorsque le champignon était dans la phase d'adaptation en présence ou en absence de levure. Après les premières 120h, l'effet inhibiteur est causé par des levures qui sont en concurrence pour les nutriments et l'espace, ce qui est cohérent avec Capdeville *et al.*, (2002). Pendant la germination des spores, 100% d'inhibition ont été observés lors des premières 12h, et 82% après 24 heures avec le chitosane de masse molaire plus élevée, ce qui semble dû à la disponibilité du chitosane dans la solution qui favorise l'interaction entre la charge positive du polymère avec les charges négatives de la membrane cellulaire : ce sont ces complexes qui seraient responsable du retard à la germination (Plascencia *et al.*, 2003). De plus, les changements structuraux dans le champignon causés par le chitosane pourraient entraîner un retard dans leur croissance apicale dû la production d'enzymes comme les chitinases et chitosanases par le champignon, suite à l'interaction du chitosane-champignon-levure et la compétition pour la source de carbone.

## CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus tout au long de cette étude ont montré que la température, l'utilisation d'une seule espèce de crevettes (*litopenaeus vanameii*), et une taille de particules plus fine (1mm), ont été des facteurs techniques importants lors de l'extraction de la chitine par le procédé de fermentation lactique de résidus de crevettes. Le modèle phénoménologique proposé permet de prédire le taux de déminéralisation en fonction de la TTA et la température. Les cinétiques de déminéralisation ( $D_{\text{MIN}}$ ) et déprotéinisation ( $D_{\text{PROT}}$ ) ont permis d'établir le temps

minimal pour enlever la plupart des minéraux et des protéines, extraire l'astaxanthine libre et raccourcir le temps de fermentation. La fermentation lactique de résidus de crevettes a permis l'extraction de la chitine par une méthode respectueuse de l'environnement, en utilisant des déchets comme matières premières tout en augmentant les avantages du procédé en promouvant la récupération des composés à forte valeur ajoutée tels que l'astaxanthine. Bien que minimal, un traitement chimique post-fermentation a été nécessaire pour produire une chitine avec des quantités de protéines et de minéraux commercialement acceptables. Les caractéristiques telles que la masse molaire, le degré d'acétylation et le taux de cristallinité ont été supérieures à celles des échantillons obtenus par des méthodes totalement chimiques. La masse molaire et le taux de cristallinité sont des caractéristiques importantes de la chitine pour des applications futures prometteuses.

L'utilisation de la méthode de désacétylation chimique hétérogène (FPT) est une méthode efficace pour produire des chitosanes à partir de chitines purifiées biologiquement avec des masses molaires élevées. Ce procédé préserve également assure la structure cristalline de chitines purifié par une méthode biologique. Ces caractéristiques font que ces biopolymères sont très prometteurs pour des applications diverses comme dans la biomédecine.

La production et la purification partielle des enzymes désacétylases de chitine à partir du champignon *Colletotrichum gloeosporioides* ont montré la possibilité de déterminer les conditions de désacétylation enzymatique, (concentration de l'enzyme, concentration du substrat et temps de réaction), ainsi que les paramètres enzymatiques ( $K_m$  et  $V_{MAX}$ ) de la réaction. Les chitine désacétylase de *Colletotrichum gloeosporioides* se sont avérées capables de désacétyler des chitines hydrolysées de faibles masses molaires. En ce qui concerne la production et l'application du chitosane, les résultats ont montré que la méthode de préparation du chitosane a une incidence sur la masse molaire et le DA du produit, donc sur leur activité antimicrobienne. Le chitosane a présenté un effet inhibiteur plus important sur la germination des spores, seul ou en présence de levure probablement à cause de l'interaction de la charge de biopolymère avec la membrane cellulaire des micro-organismes. Les levures (*P. guilliermondii*) ont montré plus d'effet sur la phase de croissance radiale en l'absence

de chitosane. L'utilisation combinée de chitosane de ( $107\text{kg.mol}^{-1}$ ) et la levure *P. guillermundii* sont proposées comme associations antifongiques candidates contre le champignon *P. digitatum*.

## Perspectives

Puisque le processus d'extraction biologique de la chitine étudié dans ce document ne parvient pas à l'élimination totale des minéraux et des protéines, les perspectives sont l'amélioration du procédé pour parvenir à une déminéralisation et déproténisation totale. Les améliorations possibles concernent l'addition d'enzymes protéolytiques. On pourra également envisager d'appliquer un système en continu pour rajouter la source de carbone et / ou de micro-organismes afin d'augmenter la production d'acide lactique et promouvoir la déminéralisation. L'analyse de l'activité protéolytique de la bactérie pourrait être évaluée afin de déterminer la température et le pH optimal pour favoriser la déproténisation. L'addition d'enzymes désacétylases pendant le procédé d'extraction de la chitine pourrait commencer partiellement la désacétylation en favorisant l'élimination des minéraux et des protéines liés de façon covalente à la molécule de chitine. En outre, les modifications physiques de la chitine, comme la réduction de la taille des particules de matières premières ou l'effet de la sonication à une longueur d'onde donnée, augmenteraient la déminéralisation et la déproténisation des déchets de crevettes.

# Introducción general

Los polímeros juegan un papel importante en la naturaleza y en la industria, dentro de los polímeros naturales se encuentran aquellos que son portadores y manipuladores de la información biológica o elementos estructurales de sistemas vivos. Por su parte los polímeros sintéticos han sido producidos y utilizados en un sin fin de aplicaciones, sin embargo, éstos últimos provocan problemas ambientales, debido a que la mayoría no son biodegradables, se derivan de recursos no renovables y en algunos casos su síntesis genera compuestos tóxicos.

Diversos métodos se han desarrollado para obtener polímeros naturales (biopolímeros) con distintas aplicaciones, beneficios ambientales y potencial industrial. Algunos de estos materiales podrían remplazar polímeros ya existentes o abrir nuevas aplicaciones comerciales. La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, es el componente estructural del exoesqueleto de: insectos, crustáceos, artrópodos etc. y de la pared celular de algunos hongos. Este biomaterial y su principal derivado, el quitosano, poseen propiedades antimicrobianas absorbentes, emulsificantes, filmogénicas, etc., y son empleados con éxito en campos tan diversos como el farmacéutico, médico, la industria alimentaria, procesadora de efluentes, agricultura, entre otros.

Por otra parte, en las últimas décadas la producción de camarón a nivel internacional ha ido en aumento, siendo México uno de los principales productores a nivel mundial. A pesar de que la industrialización y comercialización de éste crustáceo genera grandes recursos económicos en nuestro país, los residuos producidos tras la extracción de la parte comestible son responsable de un impacto ambiental negativo. El desecho de camarón al contener entre 13 - 40 % de quitina, representa una materia prima importante para la producción de un polímero natural, además de proponer una solución al problema ambiental generado por el consumo del camarón.

La quitina se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos formando una estructura organizada agrupada a complejos de proteínas, minerales y lípidos. Hasta ahora, la quitina se extrae industrialmente mediante procesos químicos sucesivos de desproteínización en medio alcalino, desmineralización en medio ácido y blanqueo mediante agentes decolorantes. A pesar de que existen numerosos progresos en los

métodos químicos de obtención de la quitina y el quitosano, el uso de soluciones concentradas de ácido y álcali continúan generando altas cantidades de desechos corrosivos, presentan efectos en el peso molecular de los biopolímeros y por consecuente en sus aplicaciones, además de hacer difícil la recuperación de sub productos como hidrolizados proteícos, calcio y pigmentos.

En los últimos años, diversos métodos biotecnológicos se han propuesto como alternativa a los métodos químicos de extracción de quitina y producción de quitosano. La fermentación ácido láctico es un proceso prometedor para la recuperación de quitina debido a la conservación del desecho, producción de ácido láctico que solubiliza los minerales y la activación de enzimas endógenas que desproteinizan el desecho. Además de que la aplicación de procesos no agresivos favorece la recuperación de subproductos aumentando la factibilidad del proceso. El uso de enzimas en la producción de quitosano representa una alternativa al uso de álcalis concentrados, disminuyendo la producción de efluentes tóxicos y la depolimerización del producto.

Diversos factores como la temperatura y pH pueden afectar el desarrollo de los microorganismos en la fermentación, y como consecuencia influir en la desmineralización, desproteinización y actividades de las enzimas endógenas del camarón sobre el complejo quitina-proteína-minerales. El método biológico de obtención de quitina pueden disminuir la depolimerización del material, al disminuir el uso de compuestos químicos sería posible la conservación del peso molecular y producir biopolímeros con características diferentes.

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio de factores que afectan los procesos de desmineralización ( $D_{MIN}$ ), desproteinización ( $D_{PROT}$ ) y desacetilación de desperdicios de camarón para obtención de quitina y quitosano mediante Bacterias lácticas (LB) y enzimas, la caracterización de los productos obtenidos, en cuanto al peso molecular ( $M_W$ ), grado de acetilación (DA), índice de cristalinidad así como la aplicación y efecto de quitosano como agente fungistáticos.

De acuerdo al objetivo planteado, los resultados de esta tesis se presentan de la siguiente manera:



En el primer capítulo se resume la definición, estructura, fuentes, métodos de obtención así como aplicaciones de la quitina y el quitosano, los principales métodos de caracterización y se hace una revisión de los trabajos de extracción y producción de éstos biopolímeros realizados anteriormente.

En el capítulo 2 se presenta la evaluación del efecto de la temperatura sobre la fermentación ácido láctica (LAF) de una mezcla de desechos de camarón como método biológico de extracción de quitina y subproductos (astaxantina). Se analizan los valores de acidificación durante la fermentación, y de  $D_{\text{PROT}}$ ,  $D_{\text{MIN}}$  y concentración de astaxantina en el desecho después de la fermentación. Mediante la metodología de superficie de respuesta se obtiene un óptimo de temperatura para la desmineralización, y se describe un modelo polinomial de segundo orden que explica la relación de la acidez y la temperatura sobre la desmineralización del desecho. También se muestra el comportamiento de las BL, velocidades de crecimiento, energía de activación y temperaturas cardinales.

En el capítulo 3 se muestra el estudio del efecto del tamaño de partícula y la especie de camarón en la recuperación de quitina y astaxantina a partir de desechos de camarón *Litopenaeus vanameii* mediante fermentación ácido láctica, utilizando las mejores condiciones establecidas en el capítulo 2. (El trabajo de extracción y cuantificación de astaxantina fue realizado por la Lic. Jessica Ramírez Hernández en el laboratorio E-314 del Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México). Se analiza el comportamiento de la  $D_{\text{MIN}}$  y  $D_{\text{PROT}}$  a lo largo de la fermentación. Parte importante de éste capítulo se refiere a la caracterización en cuanto al peso molecular, grado de acetilación y estructura cristalina, de la quitina obtenida por medio de éste método biotecnológico, así como su comparación con una quitina obtenida por método químico.

Posteriormente se expone el análisis del comportamiento estructural de la quitina obtenida por fermentación, durante su desacetilación por método químico FPT (Freeze-Pump-Thaw) por sus siglas en inglés. Se muestran los valores de pesos moleculares, grados de acetilación e índice de cristalinidad de quitinas parcialmente desacetiladas y quitosanos obtenidos, así como su comparación con la desacetilación de quitina obtenida extraída por método químico.

Al final de éste capítulo se propone la producción y purificación parcial de quitin desacetilasas a partir del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. La determinación de las condiciones de desacetilación en cuanto a la concentración de enzima, sustrato y tiempo de reacción, utilizando la enzima parcialmente desacetilada y quitosanos reacetilados con DA de 60%. Así como la aplicación de las CDA's parcialmente purificadas en quitinas procedentes de diferentes fuentes y quitinas modificadas química y físicamente.

En el capítulo 4 se estudió la actividad antimicrobiana de quitosanos obtenidos a partir de quitina biológica, sobre el crecimiento de *Penicillium digitatum*, uno de los principales hongos causantes de deterioro en frutos en etapa de germinación de esporas y crecimiento radial, así como su combinación con la levadura *P. guilliermondii* usada como agente de biocontrol.

Por último en el capítulo 5 se muestra una discusión general de los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, seguido de una conclusión y las perspectivas del mismo.

---

# CAPÍTULO UNO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

## 1.1 Introducción

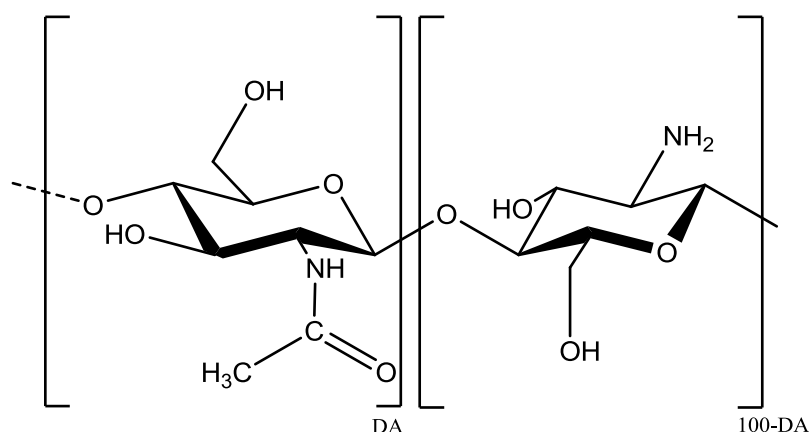
En la naturaleza existen polisacáridos de estructuras y formas diferentes que funcionan como materiales estructurales o proveedores de agua y energía, éste tipo de polisacáridos naturales se denominan biopolímeros, pueden ser usados como: adhesivos, absorbentes, lubricantes, cosméticos, como aditivos en el área farmacéutica, materiales estructurales, etc., el uso de varios de estos materiales se encuentra todavía en desarrollo aunque ya se tienen conocimientos de importantes aplicaciones en alimentos y en medicina. Entre los biopolímeros más concurrentes se encuentran la celulosa y la quitina, considerados los compuestos orgánicos más abundantes sobre la tierra, el primero refuerza la pared celular de plantas mientras que el segundo contribuye como el exoesqueleto de artrópodos y la fuerza mecánica de la pared celular de hongos y el exoesqueleto de artrópodos (Gooday *et al.*, 1992; Kurita *et al.*, 2006).

## 1.2 La quitina y el quitosano

La quitina y su principal derivado el quitosano son considerados como polímeros biofuncionales con amplia aplicación en el área de la biotecnológica, ya que además de ser recursos abundantes y renovables, también presentan diversas propiedades que incluyen: la biodegradabilidad y biocompatibilidad (Felse *et al.*, 1999).

### 1.2.1 Definición y estructura química

Tanto la quitina como el quitosano son copolímeros lineales de residuos de *N*-glucosamina (D-GlcN) y *N*-Acetil glucosamina (D-GlcNAc) distribuidos al azar y unidos mediante un enlace  $\beta$ -1,4 que produce una estructura rígida no ramificada (figura 1.1).



**Figura 1. 1** Estructura primaria de la quitina y el quitosano

Hasta ahora no existe una nomenclatura oficial para diferenciar a la quitina del quitosano, algunos autores establecen la diferencia en función del porcentaje de grupos acetilados en la molécula (grado de acetilación DA), de esta forma el quitosano se define como un copolímero de unidades de repetición D-GlcN y D-GlcNAc soluble en soluciones acuosas ligeramente ácidas, mientras que la quitina, solo es soluble en soluciones de dimetilacetamida (DMAc) o *N*-metilpirolidona (NMP) conteniendo del 5 al 7 % de cloruro de litio. La frontera entre los dos biopolímeros se encuentra alrededor de un DA del 50%, no obstante la condición de solubilidad del quitosano se satisface en la mayoría de los casos a valores de  $\text{DA} < 40\%$  de la repetición estadística de residuos. (Tervojevick *et al.*, 1988; Domard, 1998).

## 1.2.2 Propiedades

Dependiendo del estado ya sea sólido o en solución, la quitina y el quitosano presentan diferentes propiedades, en el estado sólido las propiedades dependen de la accesibilidad y la movilidad de las cadenas del polímero, parámetros relacionados con la cristalinidad y morfología. En solución, las propiedades dependen de los parámetros de solubilidad y conformación de la cadena (Domard, 1998).

### 1.2.2.1 Propiedades físicas: Estructura cristalina

La presencia y abundancia de los grupos hidroxilos (primario en C-6 y secundario en C-3) y el grupo *N*-acetyl o amino (en C-2) en las moléculas de quitina y quitosano respectivamente, tienen tendencia a la formación de puentes de hidrógeno intra e inter moleculares que favorecen la formación de agregados lineales de alta cristalinidad (Prashanth *et al.*, 2007). Las cadenas de quitina forman puentes de hidrógeno mediante los grupos C=O y H-N, que a su vez forman puentes de hidrógeno con los anillos de azúcar vecinos entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo del C-6, existe otro puente de hidrógeno que se forma entre el grupo OH del C-3 y el oxígeno del anillo, lo que aumenta la rigidez de la cadena manteniendo una estructura altamente ordenada, como se muestra en la figura 1.2 (Minke and Blackwel, 1978).

En la naturaleza se han detectado tres formas polimorfas de quitina,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -quitina en la unidad y es posible encontrar agua en las moléculas de  $\beta$ -quitina, la diferencia entre ellas se encuentra en la disposición de las cadenas. La  $\alpha$ -quitina se presenta en disposición anti paralela permitiendo la mayor cantidad de formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, cristaliza en una malla ortorombica con un grupo de espacio  $P2_12_12_1$ , la alta cantidad de puentes de hidrógeno entre las cadenas de  $\alpha$ -quitina que se forman, son los responsables de su insolubilidad en disolventes acuosos y en la mayoría de solventes orgánicos (Blackwell *et al.*, 1980). En la  $\beta$ -quitina las cadenas se encuentran en forma paralela proporcionando una fuerza intermolecular más débil y cristalizan en grupos de espacio  $P2_1$  con una malla monoclinica permitiendo la hidratación de la molécula. Por último la  $\gamma$ -quitina presenta dos cadenas paralelas en el mismo sentido y la siguiente en el sentido

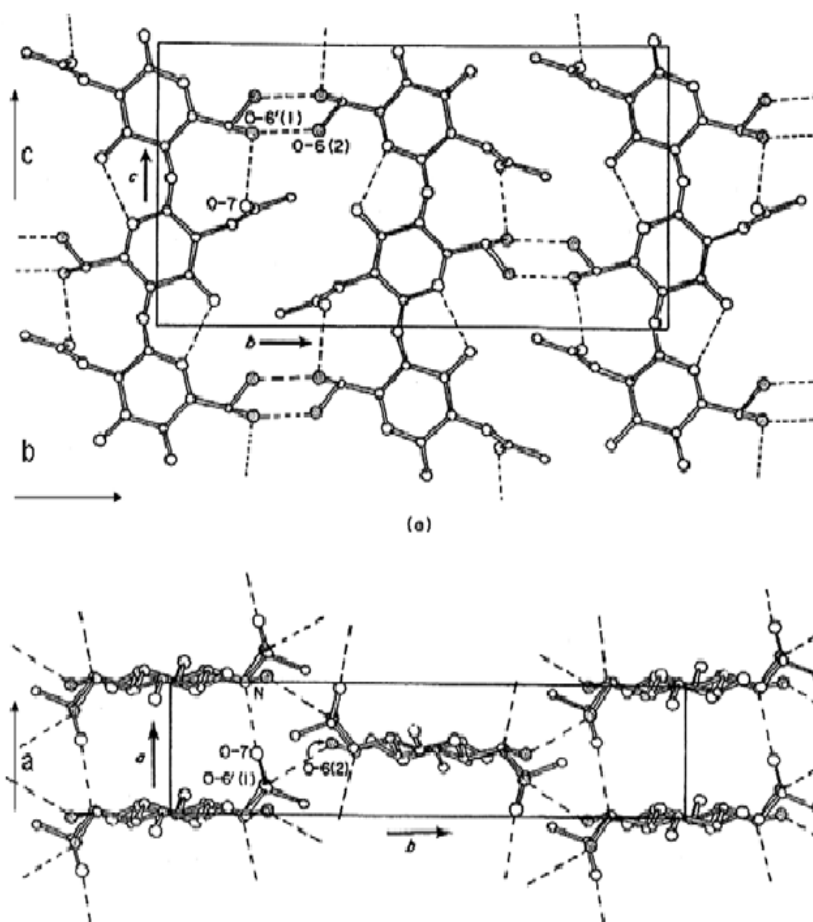
opuesto, esta alomorfa ha sido la menos estudiada y se puede considerar como una mezcla de las dos primeras.

Comparando la abundancia natural de las formas polimorfas, encontramos que la  $\alpha$ -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas cantidades y tienen la tendencia a ser transformadas en  $\alpha$ -quitina (Hirano, 1999; Pastor *et al.*, 2004).

Contrario a la quitina, el quitosano presenta diferentes alomorfos que dependen del modo de preparación de la muestra a analizar así como de su grado de acetilación y de depolimerización. Por lo general los quitosanos mantienen un solo pico característico de la quitina, ya que debido a la presencia de los grupos acetamidos en el C-2 se reduce la cantidad de puentes de hidrógeno, y como consecuencia la estructura se vuelve más inestable. Las alomorfos hidratada y anhídrida del quitosano, han sido las más estudiadas (Domard, 1998). La tabla 1.1 muestra los parámetros de malla de la estructura cristalina de la quitina y quitosano.

**Tabla 1.1** Parámetros de tamaño de malla de la estructura cristalina de la quitina y el quitosano.

	<b>a (nm)</b>	<b>b (nm)</b>	<b>c (nm)</b>	<b>Densidad (g.cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Referencia</b>
$\alpha$ quitina	0.474	1.886	1.032	1.46	Blackwell <i>et al.</i> , 1975
$\beta$ quitina anhídrida	0.485	0.926	1.038	1.46	Minke and Blackwell 1978
$\gamma$ quitina	0.47	2.84	1.03	1.47	Walton <i>et al.</i> , 1973
Quitosano hidratado	8.95	16.97	10.34	1.61	Mazeau <i>et al.</i> , 1994
Quitosano anhidro	8.07	8.44	10.34	1.65	Okuyama <i>et al.</i> , 2000



**Figura 1.2** Estructura cristalina de la  $\alpha$ -quitina propuesta por Minke and Blackwel, 1978. Proyección en los planos  $(bc)$  y  $(ab)$ .

### 1.2.2.2 Propiedades físico-químicas

Así como en todas las estructuras poliméricas, el  $M_w$  y la distribución del mismo son parámetros que afectan las propiedades de la quitina y el quitosano en solución, que aunado al grado de acetilación (DA), juegan un papel importante en sus aplicaciones. La tabla 1.2 muestra intervalos de  $M_w$ , DA, viscosidad y principales disolventes de la quitina y el quitosano.

**Tabla 1.2** Propiedades generales de la quitina y el quitosano

Propiedad	Quitina	Quitosano
Peso molecular ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$1 \times 10^6$ a $2.5 \times 10^6$	$10^5$ a $5 \times 10^3$
Grado de acetilación	>40	0 a 40
Viscosidad (Cps) 1% en 1% Ac. acético	Non soluble	200 - 2000
Humedad (% p/p)	8-10	6-7
Solubilidad	DMAc-LiCl/TCA-MC	ácidos diluidos

(Pillai *et al.*, 2009; )**1.2.2.2.1 Solubilidad**

La quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes. Para llevar a cabo la disolución de ésta molécula, es necesario introducir disolventes que induzcan las repulsiones entre las cadenas o desequilibren los puentes de hidrógeno intermoleculares presentes en el estado sólido. Los disolventes que pueden cumplir con este propósito son la hexafluoroacetona y la N,N-dimetilacetamida (DMAc) conteniendo 5-8 % LiCl (Rutherford and Austin, 1978). Recientemente, el metanol saturado con el cloruro de calcio dihidratado ha sido reportado como nuevo disolvente de la quitina utilizado anteriormente como disolvente para nylons (Tamura *et al.*, 2004).

El quitosano es insoluble en disolventes orgánicos puros, pero soluble en ácidos acuosos debido a la presencia de grupos amino libres que al ser protonados generan repulsiones en la cadena promoviendo la solubilización. Algunos ácidos orgánicos como el fórmico, acético, láctico, pirúvico y ácidos oxálicos con frecuencia son usados para su disolución. Ácidos minerales como ácidos hidroc্লóricos y nítricos también solubilizan al quitosano, sin embargo el ácido sulfúrico no es conveniente debido a las atracciones iónicas entre la cadena producida por el anión divalente del sulfato (Domard, 1998).



#### 1.2.2.2.2 Grado de N- Acetilación

Los grupos aminos de la quitina nativa se encuentra en forma acetilada, los cuales pueden estar unidos a cadenas proteicas o como aminas libres, no obstante durante los procesos comunes de extracción con ácidos y álcalis se produce una inevitable desacetilación. Las muestras de quitina presentan diferentes cantidades de grupos *N*-acetil que dependen del origen y el proceso de extracción del biopolímero, en general los grados de acetilación de la  $\alpha$ -quitina extraída se encuentran entre 90 y 95% (Kurita *et al.*, 2006). Para poder preparar una quitina con estructura uniforme (poli *N*-acetil-glucosamina) se requiere una acetilación selectiva de quitina soluble o  $\beta$ -quitina (Kurita *et al.*, 1977).

En el quitosano el contenido de grupos *N*-acetil y la repartición de los residuos a lo largo de la cadena también dependen de las condiciones de desacetilación y las fuentes de la quitina de origen (Kurita *et al.*, 2006). El grado de acetilación es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de este biopolímero debido al rol que juega en la solubilidad. Al incrementar el DA del quitosano acercándose al límite de 50%, el intervalo de pH en el que pueda ser soluble aumenta, lo cual se debe a la variación del pKa ocasionada por las propiedades polyelectrolitas del mismo (Shahidi 2005, Domard 1989).

#### 1.2.2.2.3 Peso Molecular ( $M_w$ )

El  $M_w$  de la quitina natural es mayor a  $1000 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  y el del quitosano comercial se encuentra entre 100 y  $500 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  dependiendo de la quitina de origen. Distintos factores durante la extracción de la quitina y la preparación del quitosano pueden influenciar en el  $M_w$  del biopolímero final. Altas temperaturas y concentraciones de ácidos y álcalis así como largos tiempos de reacción, pueden degradar y ocasionar depolimerización de las cadenas (Shahidi *et al.*, 2005). Diferentes autores han observado que el  $M_w$  del quitosano tiene una influencia en su actividad biológica (Shahidi *et al.*, 1999; Rabea *et al.*, 2003).

### 1.2.2.3 Propiedades biológicas

La quitina y el quitosano son biopolímeros no tóxicos, biocompatibles, y biodegradables que presentan propiedades biológicas y farmacéuticas. Su bioactividad incluye la estimulación en procesos de cicatrización, actividad hemostática, actividad inmune, mucoadhesión, actividad antimicrobiana, bacteriostática y fungistática. En la práctica médica, tejidos e hilos fabricados a partir de estos biopolímeros son usados como pieles artificiales o en suturas, los oligómeros de quitina y quitosano también presentan funciones fisiológicas incluyendo la inducción de fitoalexinas, actividad antimicrobiana y actividad inmune, ya que algunos son solubles en agua y fácilmente pueden ser inyectados intravenosamente (Nishimura, 2001; Degim *et al.*, 2002; Minami *et al.*, 2001)

El quitosano es también un polímero prometedor en la deliberación génica, preparación de cultivos celulares y en la ingeniería de tejidos. A diferencia de la celulosa inactiva, la quitina y el quitosano pueden funcionar como fibras dietéticas ya que exponen la actividad hipolipidémica, como se ha confirmado mediante la reducción de niveles de colesterol y de triglicéridos en la sangre e hígado de ratas (Nagyvary *et al.*, 1979).

### 1.2.2.4 Actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana del quitosano, es útil en la medicina, la agricultura y en conservación de alimentos (Allan and Hadwiger, 1979), los usos y el modo de acción han sido ampliamente estudiados (Lim and Hudson, 2003; Rabea *et al.*, 2003). Se ha demostrado que inhibe el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacilo subtilis*, y *Staphylococcus aureus*, (Hadwiger *et al.*, 1984; Uchida *et al.*, 1989). El quitosano también ha mostrado actividad fungistática inhibiendo el crecimiento de hongos como: *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solana*, *Trichophyton equinum* (Plascencia *et al.*, 2003). En la agricultura la quitina y el quitosano son utilizados como agentes de biocontrol contra hongos, (Hirano *et al.*, 1990; Freepons, 1997). La tabla 1.3 muestra concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de distintos quitosanos para diferentes microorganismos.

La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como el tipo de quitosano, el grado de depolimerización, el hospedero, la composición nutritiva y química del sustrato, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas. A pesar de que el quitosano y sus derivados son efectivos como agentes antimicrobianos, existe una clara diferencia entre ellos. La actividad inhibitoria del quitosano ha sido demostrada contra hongos fitopatógenos, siendo más alta a pH 6.0 que a pH 7.5 (Rabea *et al.*, 2003).

#### **1.2.2.4.1 Mecanismos de acción del quitosano**

La manera exacta en la que el quitosano y sus derivados actúan es todavía desconocida, aún así varios mecanismos han sido propuestos, uno de ellos se basa en la interacción entre la carga positiva de las moléculas de quitosano y las cargas negativas de las membranas celulares alterando su permeabilidad y permitiendo la pérdida de constituyentes intracelulares (Rabea *et al.*, 2003). Se cree que el quitosano en bajas concentraciones actúa en la superficie de bacterias interactuando con la carga negativa ocasionando aglutinación, mientras que a altas concentraciones el gran número de cargas positivas podrían impartir una carga neta positiva manteniéndolas en suspensión (Rabea *et al.*, 2003).

El quitosano también puede actuar como agente quelante que se une selectivamente con trazas de metales inhibiendo la producción de toxinas de los microorganismos, en plantas puede ser capaz de activar distintos mecanismos de defensa en el tejido del hospedero, funciona como un agente enlazante de agua inhibiendo a varias enzimas. Existe la posibilidad de que quitosanos de muy bajo peso molecular lleguen a enlazarse con el ADN e inhibir la síntesis de ARN y por consiguiente de proteínas (Rabea *et al.*, 2003).

**Tabla 1.3** Concentración mínima inhibitoria del quitosano para diferentes bacterias y hongos.

Microorganismo	MIC (ppm)
<b>Bacterias</b>	
<b>Gram positivas</b>	
<i>Micrococcus luteus</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	100
<i>Listeria monocytogenes</i>	100
<i>Bacillus cereus</i>	1000
<b>Gram negativas</b>	
<i>Escherichia coli</i>	100
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200
<i>Shigella dysenteriae</i>	200
<i>Vibrio cholerae</i>	200
<i>Erwinia carotovora subsp.</i>	200
<i>Erwinia sp.</i>	500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500
<i>Aeromonas Hydrophila YMI</i>	500
<i>Xanthomonas campestris</i>	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700
<i>Aeromonas Hydrophila CCRC 13881</i>	2000
<i>Salmonella typhimurium</i>	> 2000
<b>Hongos</b>	
<i>Botrytis cinérea</i>	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Drechstera sorokiana</i>	10
<i>Micronectriella rivalis</i>	10
<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Rhizoctonia solani</i>	1000
<i>Trichophyton equinum</i>	2500

Shahidi et al., 1999; Rabea et al., 2003

### 1.2.2.5 Caracterización de la quitina y el quitosano

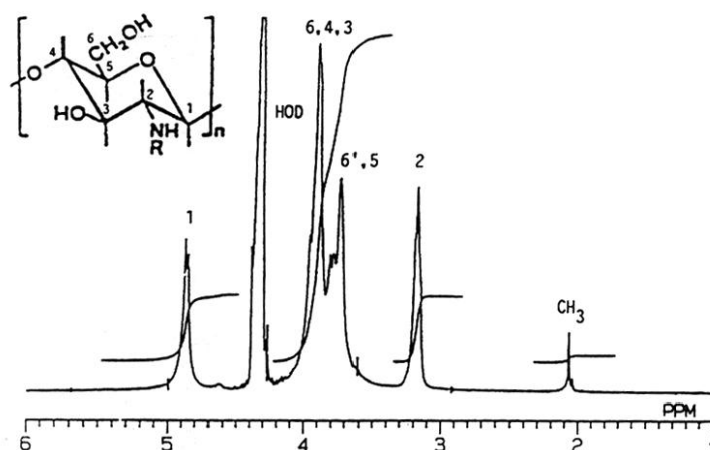
#### 1.2.2.5.1 Determinación del grado de acetilación

Diversos métodos para determinar el grado de acetilación han sido estudiados, tales como titulaciones ácido-base, titulaciones conductimétricas, espectroscopia de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -NMR) (Roberts, 1992). Entre estas las espectroscopias son relativamente fáciles y confiables. Mediante IR la proporción de absorbancia entre  $A_{1550}/A_{2878}$  fue sugerida por Sannan *et al.*, 1978, proporciones entre  $A_{1655}/A_{3450}$ ,  $A_{1655}/A_{2867}$ , y  $A_{1655}/A_{3450}$  han sido reportados (Roberts, 1992). La  $^1\text{H}$ -NMR en  $\text{D}_2\text{O}$  o en  $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$  es uno de los métodos más utilizados (Hirai *et al.*, 1991). Espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -NMR y  $^{15}\text{N}$ -NMR en estado sólido han sido aplicadas en la determinación del grupo acetil (Kurita *et al.*, 2006). La espectroscopia de NMR presenta la ventaja de la utilización de una pequeña cantidad de muestra y pueden analizarse muestras en forma líquida o sólida. Para la determinación del grado de acetilación del quitosano el método más común es la espectroscopia de  $^1\text{H}$ -NMR en medio líquido, donde las muestras son disueltas en solución de  $\text{D}_2\text{O}$  acidificado con DCl y el DA se determina con la relación del protón del metil (1-4) 2 acetomido-2-dexoxy- b- D- glucan (a) y la referencia de los protones H-2 al H-6 (b) figura 1.3 de acuerdo a Hirai *et al.*, 1991, como se expresa en la ecuación 1.1.

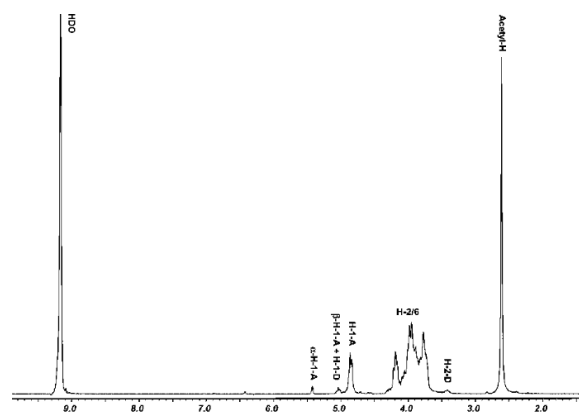
$$\text{DA}(\%) = \left[ \frac{\frac{1}{3} A_{\text{CH}_3}}{\frac{1}{6} \sum_{i=2}^6 A H_i} \right] \times 100 \quad (1.1)$$

Einbu *et al.* (2008) han reportado un método de determinación del DA en muestras de quitinas utilizando DCl/ $\text{D}_2\text{O}$  (37% v/v), donde se determinan las fracciones acetiladas en función de los protones del extremo reductor H-1 y H-2 figura 1.4, aplicando la Ecuación 2.2.

$$F_A = \frac{(I_{\alpha H1A} + I_{(\beta H1A+H1D)} + I_{H1A}) - I_{H2D}}{(I_{\alpha H1A} + I_{(\beta H1A+H1D)} + I_{H1A})} \quad (1.2)$$



**Figura 1. 3** Espectro de quitosano en RMN<sup>1</sup>H a 400 MHz en medio acidificado de acuerdo a Hirai *et al.*, 1991.



**Figura 1. 4** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de quitina en DCL/D<sub>2</sub>O a 400MHZ (Einbu *et al.*, 2008)

#### 1.2.2.5.2 Determinación del peso molecular

Debido a la insolubilidad de la quitina en diferentes disolventes, existe una limitación para la determinación del  $M_w$ . El método más utilizado para este propósito es la determinación de la viscosidad intrínseca, que con ayuda de la ecuación de Mark Houwink (Ecuación 1.3) proporciona el valor del  $M_w$  de manera indirecta.

Distintos métodos como: HPLC, Cromatografía de permeación en gel y viscosidad han sido utilizados para la determinación del  $M_w$  en quitosanos. La cromatografía de permeación de gel (GPC), también llamada cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) acoplada a light scattering es una de las técnicas de mayor confiabilidad que permite no solo la determinación del peso molecular sino también la distribución del

mismo. La viscosimetría es un método rápido y simple en la determinación del  $M_w$  por lo que ha sido ampliamente estudiado (Einbu *et al.*, 2004).

$$\eta = KM_w^a \quad (1.3)$$

Donde  $\eta$  representa la viscosidad intrínseca,  $M_w$  el Peso molecular y los parámetros de  $K$  y  $a$  dependen de la naturaleza del disolvente y del polímero (Kumar, 2000). Tabla 1.4 presenta diversos parámetros de  $K$  y  $a$  para distintos disolventes. La viscosidad de las soluciones de la quitina y el quitosano se ven afectadas por el grado de acetilación, peso molecular, concentración del polímero, pH y temperatura (Rabea *et al.*, 2003).

**Tabla 1.4** Parámetros de Mark-Houwink para la determinación del peso molecular de la quitina y el quitosano.

Disolvente	$K(\text{ml/g})$	$a$	$T\text{ }^\circ\text{C}$	$Dn/dc$	Referencia
<b>Quitina</b>					
2.77 M Na OH	0.1	0.68	20	0.145	Einbu <i>et al.</i> , 2004
DMAc/LiCl 5%	$7.6 \times 10^{-3}$	0.95	30	0.091	Poirier <i>et al.</i> , 2002
DMAc/LiCl 5%	$2.4 \times 10^{-1}$	0.69	25	0.1	Terbojevich <i>et al.</i> , 1988
<b>Quitosano</b>					
0.3M AcOH/ 0.2M AcONa	$7.9 \times 10^{-2}$	0.796	25	0.19	Brugnerotto <i>et al.</i> , 2001
0.02M buffer de acetatos/0.1 M NaCl	$8.43 \times 10^{-2}$	0.92	25	0.203	Berth <i>et al.</i> , 2002

Tabla descrita por Rinaudo, 2006.

### 1.2.2.6 Aplicaciones

Las propiedades específicas de la quitina, el quitosano y derivados, los hacen útiles a nivel industrial: En la agricultura puede funcionar como inductor de mecanismos de defensa en las plantas y como recubrimiento de frutos postcosecha, en tratamiento de aguas residuales como agente floculante, en la industria alimenticia como aditivo, en cosméticos como agente hidratante y recientemente en farmacéutica como agente en biomedicina (Rabea *et al.*, 2003; Synowiecki *et al.*, 2003). El quitosano al ser el único biopolímero catiónico presenta diferentes aplicaciones, en soluciones como gel, formación de recubrimientos y fibras. En el esquema 1.1, se muestran algunas de las aplicaciones del quitosano con base al área de aplicación.

La quitina presenta una baja toxicidad, es inerte en el tracto intestinal de mamíferos, es biodegradable debido a la presencia de quitinasas distribuidas ampliamente en la

naturaleza en bacterias, hongos y plantas, así como en el sistema digestivo de diversos animales, la quitina se ha usado para preparar columnas de cromatografía por afinidad, para inmovilización de enzimas como absorbente de compuestos contaminantes como complejos de tioufato de plata como fibras en farmacéutica, (Kumar *et al.*, 2000, Rinaudo, 2006).



**Esquema 1.1.** Aplicaciones de la quitina y el quitosano de acuerdo al área (Synowiecki *et al.*, 2003; Rinaudo 2006 ; Prashanth and Tharanathan 2007).



## 1.3 Fuentes de quitina y quitosano

### 1.3.1 Quitina en la naturaleza

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Hongos, Algas, Protozoos, Moluscos, Artrópodos entre otros), sin embargo el exoesqueletos de artrópodos es la fuente más accesible, en especial los crustáceos marinos como cangrejos y camarones ya que se encuentran disponibles como desecho de la industria marisquera (Kurita, 2006).

#### 1.3.1.1 Quitina de crustáceos

La quitina se encuentra en la naturaleza ligada a otros componentes estructurales como: minerales, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos estos últimos para formar paredes celulares en los hongos. En insectos y otros invertebrados la quitina se encuentra siempre ligada a proteínas específicas mediante enlaces covalentes y no covalentes presentando estructuras ordenadas, con diferentes grados de mineralización, en particular calcificación y esclerotización, interacciones con grupos fenólicos y lípidos (Roberts, 1992).

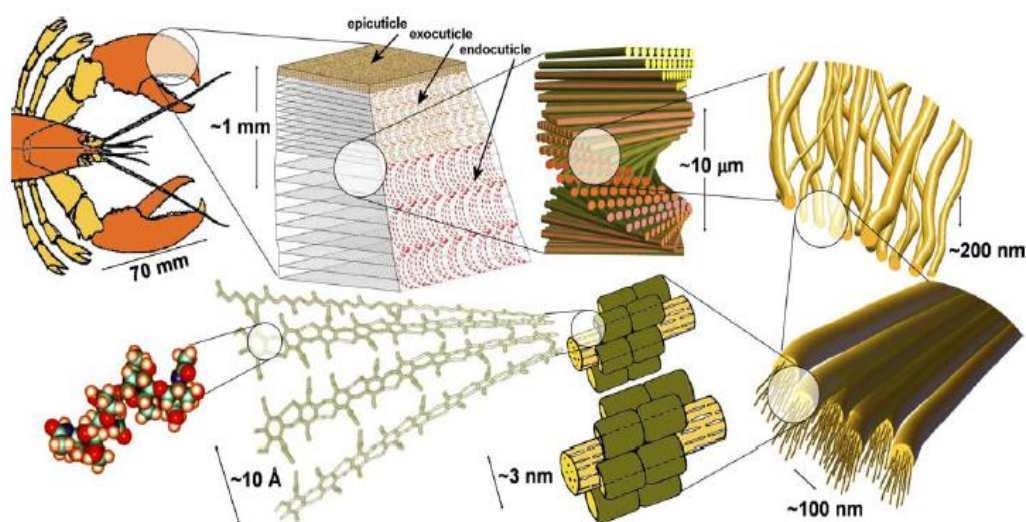
Los crustáceos son la mayor fuente de quitina a nivel industrial con una producción de entre 2200 Ton (Synowiecki *et al.*, 2003). El contenido de quitina en crustáceos varía entre 2 y 12% del total de masa corporal, el contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides en el exoesqueleto de crustáceos varía dependiendo de la especie, parte del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo. El exoesqueleto contiene alrededor del 15-40% de quitina ( $\alpha$ -quitina), proteínas alrededor del 20 al 40% y carbonato de calcio entre 20-50%, como componentes principales, y presenta en menor cantidad pigmentos y otras sales metálicas. La proteína proviene del tejido conectivo, el contenido de minerales está influenciado con la edad y ciclo reproductivo del crustáceo, las especies más viejas presentan un exoesqueleto mucho mas calcificado y baja cantidad de quitina y la cantidad de lípidos es generalmente debido a residuo de musculo o vísceras. En la tabla 1.5 se muestran los porcentajes de proteínas, cenizas, lípidos y quitina presentes en algunas especies de crustáceos estudiados.

**Tabla 1.5** Composición química proximal en porcentaje (% v/v ) en base seca de del exoesqueleto de crustáceos.

	Fuente de quitina	Proteína	Quitina	Ceniza	Lípidos
cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	22	31	46	1.0
camaron	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Cragon cragon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Langosta	<i>Procamborus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
krill	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

Cira, 2000; Peniche, 2006.

El exoesqueleto de crustáceos es una capa no celular secretada por la epidermis, el cual se encuentra formando una organización jerárquica de varios niveles estructurales. En el nivel molecular se encuentra la quitina, la cual mediante su alineamiento antiparalelo forma estructuras altamente cristalinas, el siguiente nivel estructural es el arreglo entre las moléculas que se encuentran ligadas en la periferia a proteínas globulares formando estrechas unidades llamadas nanofibrillas, el tipo de proteínas presentes contiene  $\alpha$ -aminoácidos como la glicina, tirosina, glicoproteínas conteniendo residuos histidil y aspartil, ácido aspártico, serina y glicina. (Rudrapatnan *et al.*, 2003). Las nanofibrillas de quitina-proteína se agrupan formando racimos, que a su vez forman capas planas horizontales y paralelas de fibrillas que cambian de dirección de un plano a otro en continua rotación, Este complejo forma una red o lámina que agrupa a la quitina y proteínas con minerales que se encuentran por lo general en forma de cristales de  $\text{CaCO}_3$  y lípidos (Raabe *et al.*, 2005) (Figura 1.6). Dentro del complejo quitina-proteína-minerales se encuentran distintos tipos de carotenoides como la luteína,  $\beta$ -caroteno, astaxantina y derivados que se encuentran formando conjugados con las proteínas, combinados con los grupos amino de la quitina mediante enlaces barbonilamino (Rudrapatnan *et al.*, 2003).



**Figura 1.5** Estructura microfibrilar del exoesqueleto de crustáceos de acuerdo a Rabea *et al.*, 2005.

### 1.3.1.2 Fuente microbiana de quitina y quitosano

Diferentes hongos como: *Allomicetos*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusrium*, *Mucor*, *Rhisopus*, *Choanephora*, *Tamnidum*, *Zygorrynchus* y *Phycomicetos* presentan en su pared celular quitina, quitosano y algunos polisacáridos ácidos, que proporcionan otra fuente de materia prima, además de que pueden ser extraídos de los residuos de biomasa en la producción de enzimas, vitaminas antibióticos hormonas y otros productos farmacéuticos (Synowiecki *et al.*, 2003).

## 1.3.2 Métodos de extracción de quitina

### 1.3.2.1 Método químico

La obtención de la quitina en la industria a partir de crustáceos se lleva a cabo mediante procesos químicos sucesivos de desproteinización en medio alcalino, desmineralización en medio ácido y blanqueo mediante agentes decolorantes, el orden de los dos primeros pasos dependen de los subproductos que se deseen obtener, (Synowiecki *et al.*, 2003; Shahidi, 2005). Las proteínas se extraen generalmente con la ayuda de soluciones alcalinas de NaOH o KOH, aunque también se han utilizado soluciones de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>S, CaHSO<sub>3</sub> y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Pratya *et al.*, 2006). La efectividad de la desproteinización depende de la temperatura, la concentración del álcali y la proporción del desecho

en solución, diversos estudios han probado concentraciones que varían entre 1M - 4M a temperaturas de 25 - 100°C y tiempos desde 0.5 a 72 horas, sin embargo, las altas concentraciones de álcali y altas temperaturas de reacción, pueden producir la desacetilación y degradación de la quitina (Synowiecki *et al.*, 2003).

En el caso de la desmineralización, diferentes tipos de ácidos fuertes como (HCl, HNO<sub>3</sub> o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o débiles (CH<sub>3</sub>COOH, HCOOH) han sido utilizados. El objetivo es la solubilización del carbonato de calcio. Las concentraciones evaluadas varían desde 0.2M a 6 M a temperaturas de -20°C a 100°C (No *et al.*, 1995; Percot *et al.*, 2003; Lamarque *et al.*, 2005; Praty *et al.*, 2006), estudios han demostrado completa desmineralización del desecho cuando la concentración del ácido es estequiométricamente mayor que la de la cantidad de minerales. El blanqueo de la quitina solo se realiza cuando es indispensable tener un producto completamente puro, ya que el pigmento no afecta la influencia del comportamiento del polímero en solución, su reactividad o propiedades fisicoquímicas. Por lo general para el blanqueo se utilizan soluciones de hipoclorito de sodio, acetona absoluta, cloroformo, peróxido de hidrógeno, acetato de etilo, etanol o una mezcla de ellos (Synowiecki *et al.*, 2003; Percot *et al.*, 2003).

Una de las grandes desventajas del método de purificación químico de la quitina, es la alta consumación de energía además de la producción de desechos corrosivos de ácido y álcali que contaminan el ambiente y tienen que ser tratados, además de producir una fuerte degradación del polímero. Otra gran desventaja es que las proteínas extraídas mediante estos métodos no pueden ser reutilizadas ya que pierden valor debido a la formación de lisinoalanina y otros derivados de aminoácidos (Beaney *et al.*, 2005).

### 1.3.2.2 Método biológico

Estudios bioquímicos y estructurales durante los ciclos de desarrollo de crustáceos sugieren la degradación de la vieja cutícula mediante hidrólisis de las proteínas y la quitina mediante diversas enzimas, los productos obtenidos son recuperados y reutilizados para la síntesis de la nueva cutícula, el carbonato de calcio también es solubilizado y reabsorbido durante el mismo ciclo, esto mediante la acción de enzimas carbonic anhidrasa y algunas fosfatasas. Debido a que es evidente la

eficiencia de mecanismos biológicos en la desmineralización, desproteinización e hidrólisis de la quitina en la naturaleza, diversos estudios se han enfocado en la utilización de métodos biológicos para la extracción de quitina como una alternativa al método químico (Bustos *et al.*, 1997).

Existen estudios en los que se han evaluado enzimas enfocadas en la hidrólisis de las proteínas ligadas al desecho (Duarte *et al.*, 2006), proteasas adicionadas, propias al desecho o producidas por microorganismos internos. El uso de fermentaciones buscan solubilizar los minerales ligados al desecho mediante la producción de ácidos orgánicos (Rao *et al.*, 2000; Cira *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005) así como utilizar las enzimas provenientes de vísceras presentes en el desecho para eliminar las proteínas. Por su parte la mezcla de diferentes microorganismo en cofermentaciones busca no solo solubilizar el carbonato de calcio sino a su vez favorecer la hidrólisis de las proteínas mediante producción de enzimas (Jung *et al.*, 2006).

#### **1.3.2.2.1 Fermentación ácido láctica como método de extracción de quitina**

La fermentación microbiana juega un importante rol en la conservación de productos y derivados alimenticios debido a la producción de ácidos orgánicos que evitan el desarrollo de microorganismos patógenos. El uso de fermentaciones ácido lácticas para la extracción de quitina, no solo permite recuperar este biopolímero de manera más amigable, si no también permite resolver el problema ambiental que generan la producción de grandes cantidades de desechos de crustáceos, y recuperar compuestos de valor agregado. Mediante la fermentación ácido láctica se obtiene un licor rico en proteínas que puede ser utilizado como suplemento alimenticio en las dietas de animales así como minerales y pigmentos.

Las bacterias comúnmente utilizadas son las BL, las cuales producen ácido láctico a partir de una fuente de carbono adicionada al medio, entre las que se han estudiado, glucosa, sacarosa, lactosa, suero de leche, entre otros. El ácido producido genera un descenso en el pH durante las primeras horas de fermentación lo que evita el crecimiento de microorganismo de descomposición, el LA reacciona con el carbonato de calcio presente en el desecho para producir lactato de calcio el cual

precipita y puede ser removido mediante lavados (ecuación 1.4). Simultáneamente las enzimas proteolíticas producidas por el microorganismo o presentes en el desecho en combinación con la temperatura y el pH, llevando a cabo la desproteinización.



La eficiencia en la producción de ácido láctico durante la fermentación depende de diferentes factores tales como cantidad de inóculo, fuente de carbono, pH inicial y durante la fermentación, así como del tiempo (Rao *et al.*, 2000). Diferentes condiciones de fermentación y microorganismos evaluados en la literatura se presentan en la tabla 1.5.

#### 1.3.2.2.2 Hidrólisis enzimática de proteínas

Las proteasa son hasta ahora el grupo más importantes de enzimas producidas comercialmente ya que se utilizan en diferentes áreas y aplicaciones, como detergentes, ablandadores de carne, fotografía, ente otros (Yang *et al.*, 2000). Entre los microorganismos más estudiados en la producción de enzimas se encuentran *Bacillus spp.*, *B. subtilis*, *B. firmus* (Yang *et al.*, 2000). Recientemente se ha estudiado el uso de enzimas proteolíticas como alternativa al método químico en la desproteinización de desechos de crustáceos. Utilizando estos métodos la proteína puede ser recuperada en la forma de hidrolizados que pueden funcionar como saborizantes y pueden ser incorporados a bases de alimentos de acuicultura, además los hidrolizados recuperados puede ser fuente de péptidos biológicos activo con potenciales aplicaciones farmacéuticas así como estimulantes de crecimiento en alimentos de animales (Duarte *et al.*, 2006). A pesar de que la hidrólisis enzimática no es capaz de remover el 100% de proteínas, el contenido restante es fácilmente removido durante la producción química del quitosano. Enzimas proteolíticas pertenecientes a *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Stereptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaeus* y *Aspergillus oryzae* han sido utilizadas para desproteinización de desechos de camarón (Bustos *et al.*, 1994)

**Tabla 1.6** Principales microorganismos y su eficiencia en la extracción biológica de quitina.

Microorganismo	Fuente de desecho	Tiempo	Fuente de carbono (FC)	Eficiencia (%)		Referencia
				D <sub>MIN</sub>	D <sub>PROT</sub>	
Fermentación una etapa						
<i>L. paracasei</i> A3	<i>Nephrops norvegicus</i>	48h	Glucosa	61	77.5	Zakaria <i>et al.</i> , 1997
<i>Lactobacillus</i>	Camarón	28h	Glucosa	90	86	Rao <i>et al.</i> , 2001
<i>L. paracasei</i> A3	<i>Procambarus clarkii</i>	72h	Dextrosa	97.2	94	Cremades <i>et al.</i> , 2001
<i>L. pentosus</i> 4023	<i>Procambarus claeckii</i>	30h	Suero de leche	90.1	81.5	Bautista <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactobacillus</i> spp.B2	<i>Peneaeus</i> sp.	120h	Sacarosa, Lactosa, suero de leche	87.6	85	Cira <i>et al.</i> , 2002
<i>S. faecium</i> M74, <i>L. Plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>	<i>Nephrops norvegicus</i>	144h	Glucosa	93.8	NM	Healey <i>et al.</i> , 2003
<i>L. salvarius</i> , <i>P. acidilactici</i>	Gamba	120h	Glucosa	68.2	--	Beaney <i>et al.</i> , 2005
<i>L. Plantarum</i>	Camarón	18h	Glucosa	88	83	Rao <i>et al.</i> , 2005
<i>L. paracasei</i>	Cangrejo	120h	Glucosa	81	NM	Jung <i>et al.</i> , 2006
<i>B. licheniformis</i>	<i>Penaeus monodon</i>	48h		99	98.8	
<i>P. acidolactici</i>	Camarón	24-72h	Glucosa	97.9	72.5	Bhaskar <i>et al.</i> , 2007
<i>B. suptillis</i>						
<i>B. suptillis</i>	<i>Metapenaeus dopsoni</i>	360h	Sacarosa	72	84	Sini <i>et al.</i> , 2007
<i>P. aeruginosa</i>	Cangrejo	144h	Glucosa	92	63	Oh <i>et al.</i> , 2007
Fermentación en 2 etapas (cofermentación, adición de dos microorganismos)						
<i>L. paracasei</i> <i>S. marcescens</i> FS-3	<i>Chionoectes japonicus</i>	288h	Glucosa	94.3	68.9	Jung <i>et al.</i> , 2007
GM, <i>L. casei</i> MRS1	<i>Cragon cragon</i>	96h	Glucosa	99.7	90.8	Xu <i>et al.</i> , 2008
GM, <i>L. casei</i> MRS1	<i>Penaeus monodon</i>	110h	Glucosa	99.6	97.4	Xu <i>et al.</i> , 2008

NM: no mencionado, D<sub>MIN</sub> Porcentaje de desmineralización, D<sub>PROT</sub> Porcentaje de desproteínización

Algunos de los métodos biológicos de extracción de quitina se han combinado con tratamientos químicos menores (Cira *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2000) con el fin de alcanzar la total purificación de la quitina conservando sus características.

### 1.3.3 Métodos de obtención de quitosano

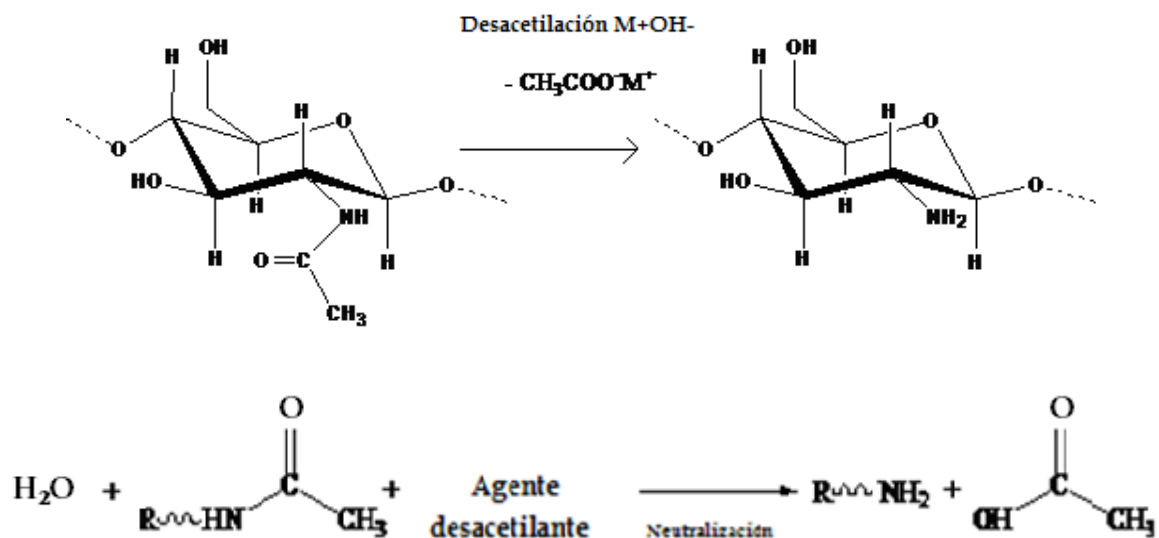
#### 1.3.3.1 Desacetilación química

El quitosano se obtiene químicamente mediante la N-desacetilación de la quitina en medio alcalino (Figura 1.6), existen diferentes estudios en los que se han evaluado diferentes combinaciones de temperaturas, concentraciones y tiempos de reacción para favorecer y optimizar la reacción, sin embargo estos parámetros deben ser estrictamente controlados ya que influyen en el grado de acetilación, peso molecular distribución molecular y por consiguiente en las propiedades y aplicaciones del biopolímero resultante (Synowiecki *et al.*, 2003).

Existen dos tipos de desacetilación química: la desacetilación homogénea y la heterogénea, la primera se lleva a cabo a bajas temperaturas o a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, con lo que se asegura la uniformidad de la reacción (Nemtsev *et al.*, 2002) y la distribución de los grupos acetil resultante es arbitraria.

La desacetilación heterogénea es aquella en la que se utilizan altas temperaturas (100 a 140° C) las cuales favorecen la velocidad de la reacción, sin embargo la desacetilación se da con mayor rapidez en las regiones amorfas del biopolímero que en las áreas cristalinas lo que proporcionan una distribución de bloque e impide una mayor desacetilación (Prhajtan *et al.*, 2008). La presencia de oxígeno durante la desacetilación influye en la degradación del polisacárido y da como resultado una disminución en la viscosidad y el peso molecular de los productos, estos cambios pueden ser limitados mediante la adición de nitrógeno o argón al medio. Existen pretratamientos en los que se pretende la mayor penetración del NaOH en la quitina así como la reducción de la cristalinidad de la materia prima para asegurar la completa desacetilación (Synowiecki *et al.*, 2003). Algunos autores han propuesto la desacetilación completa mediante la repetición del proceso y evitando la presencia del oxígeno durante el mismo (Domard *and* Rinaudo 1983; Mima *et al.*, 1983) (Lamarque *et al.*, 2004).





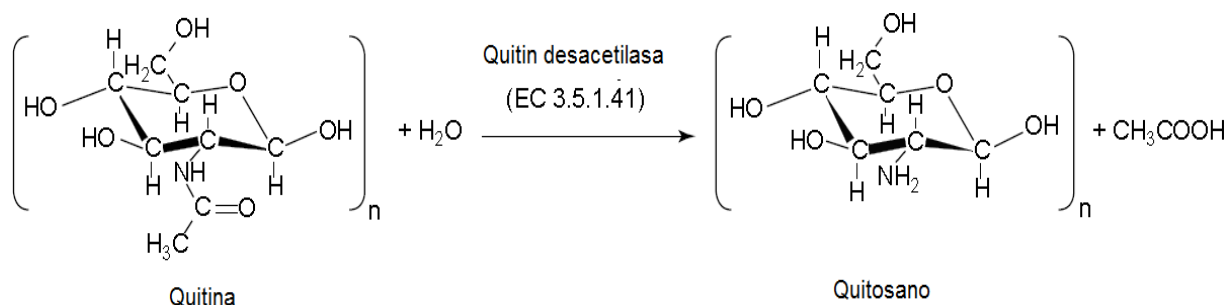
**Figura 1. 6** Desacetilación de las unidades de GlcNAc para obtención de quitosano, el agente desacetilante puede ser una base fuerte.

El método químico de desacetilación del quitosano presenta 3 importantes desventajas, 1) consume considerables cantidades de energía, 2) Desperdicia altas concentraciones de soluciones alcalinas y 3) Los productos finales presentan diversos pesos moleculares con heterogénea disposición de grupos acetilados en la molécula, dependiendo del tipo de desacetilación química aplicada

### 1.3.3.2 Desacetilación biológica

Una alternativa o proceso complementario a la desacetilación química es el uso de enzimas desacetilasas, que favorecen a que el proceso sea controlado y no degradativo (Kafetzopoulos *et al.*, 1993).

Las enzimas que catalizan la conversión de la quitina a quitosano mediante la hidrólisis de los residuos de *N*-acetil glucosamina se denomina quitina desacetilasas abreviadas como CDA y clasificadas por la comisión de número de enzima (EC) como 3.5.1.41, donde el primer número la clasifica como enzima hidrolasa, que forma dos productos de un substrato por hidrólisis. Figura 1.7. La presencia de la actividad desacetilasa ha sido reportada en diferentes hongos e insectos así como en algunas especies de zigomicetos (Tsigos *et al.*, 2000).



**Figura 1.7** Reacción de desacetilación enzimática descrita por Tsigos *et al.*, 2000

Las quitin desacetilasas fueron identificadas y parcialmente purificadas por primera vez de extractos producidos por el hongo *Mucor roxii* (Araki and Ito, 1975), posteriormente han sido aislados de hongos como: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Absidia coerulea*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*. Todas estas enzimas han sido reportadas como glicoproteínas secretadas intracelular o extracelularmente, presentan una termoestabilidad remarcable funcionando de manera óptima a 50°C, de acuerdo al peso molecular y el contenido de carbohidratos varían ampliamente al igual que el rango de pH óptimo.

Existen estudios en los que los genes que codifican a las CDA de *M. rouxii*, *S. cerevisiae*, y *C. Lindemuthianum* ATCC56676 han sido clonadas para obtener una sobreproducción de la enzima para ser purificadas y caracterizadas (Shrestha *et al.*, 2004). Las enzimas de *C. lindemuthianum* pueden actuar en la quitina natural (Tsigos *et al.*, 1995) mientras que las otras enzimas sólo pueden actuar en quitinas solubles, o parcialmente desacetiladas, además de no ser inhibidas por la presencia de acetato, sin embargo estudios en la producción y purificación de estas enzimas siguen en desarrollo. La tabla 1.6 muestra las características principales de las quitinas desacetilasas extraídas de diferentes fuentes.

Estudios sobre la biosíntesis en hongos sugieren que la quitina sintetasa opera al mismo tiempo que la quitina desacetilasa, la primera enzima sintetiza a la quitina mediante la polimerización de residuos de *N*-acetilglucosaminil de uridina 5-difosfo-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) y la segunda hidroliza los grupos *N*-acetamido

en las cadenas de quitina, actuando de manera más eficiente en la quitina cruda que en quitina microfibrilar (Kafetzopoulos *et al.*, 1993).

**Tabla 1.7** Principales características de las quitin desacetilasas más estudiadas.

Microorganismo	Localización	Características				Referencia
		$M_w$ (kDa)	Óptimos		Inhibición de acetato	
			pH	T(°C)		
<i>Mucor rouxii</i>	Intracelular	75	4.5	50	Si	Kafetzopoul os <i>et al.</i> , 1993
<i>Absidia coerulea</i>	Intracelular	75	5	50	si	Gao <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus nidulans</i>	Extracelular	27	7	50	no	Alfonso <i>et</i> <i>al.</i> , 1995
<i>C. lindemuthianum</i> (DSM 63144)	Extracelular	150	8.5	50	no	Tsigos <i>et</i> <i>al.</i> , 1995
<i>C. lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	Extracelular	24	11.5	50	no	Tokuyasu <i>et</i> <i>al.</i> , 1996
<i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis</i>	Extracelular	55	7.5	55	no	Cai <i>et al.</i> , 2006
<i>Mortierella sp.</i>	Extracelular	50	5.5	60	no	Young-Ju <i>et</i> <i>al.</i> , 2008

#### 1.3.3.2.1 Modo de acción de las enzimas desacetilasas

El modo de acción de las CDAs ha sido estudiado en polímeros de quitosano y en oligómeros de quitina, las enzimas provenientes de *Mucor rouxii* han sido investigadas en quitosanos desacetilados aleatoriamente con DA de alrededor de 32% con un grado de polimerización promedio de 30, donde se observó que la enzima hidroliza los grupos acetilos del sustrato de acuerdo a un mecanismo de ataque múltiple, es decir, la enzima forma un complejo enzima-polímero y cataliza la hidrólisis de grupos acetilos, posteriormente se disocia y forma un nuevo complejo. En relación a la desacetilación de quitin-oligómeros se ha observado que el tamaño del oligómero juega un papel importante ya que puede desacetilar oligómeros que presenten a menos tres grupos acetilados. Desacetilasas de *C. lindemuthianum* han

sido capaces de desacetilar distintos carbohidratos acetilados así como realizar la reacción inversa (Tsigos *et al.*, 2000).

### **1.3.3.3 Determinación de actividad, producción y purificación de enzimas desacetilasas**

En general, las enzimas se encuentran formando parte de mezclas complejas, en agregados moleculares, complejos con otras enzimas, proteínas inertes, ácidos nucleídos, polisacáridos o lípidos, para su estudio es indispensable un proceso de purificación. En el caso de las enzimas intracelulares es necesario un paso previo de rompimiento celular, por su parte las enzimas extracelulares se encuentran junto a una enorme gama de productos celulares excretados y residuos del medio.

Los métodos de estimación de la actividad desacetilasa presentes en la literatura se refieren tanto a la estimación de formación de producto (acetato) como disminución del grupo acetilado en el sustrato. Kausss and Bautch en 1988 propusieron un método espectrofotométrico para la determinación de la actividad, en donde los grupos aminos desacetilados del sustrato desarrollan color que al ser comparados con la muestra patrón (sin desacetilar) proporciona indirectamente la cantidad de acetato en el medio. Ksuss and Bautch definieron como una unidad de actividad la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 $\mu$ mol de acetato a partir de etilen-glicol-quitina, éste método ha sido posteriormente utilizado por Nahar *et al.* (2004), Cai *et al.* (2006). Kafetzopoulos *et al.* en 1993 determinó la cantidad de acetato producido en una reacción de desacetilación mediante el método enzimático de Bergmeyer, en donde 3 enzimas acopladas (acetyl CoA sintetasa, citrato sintetasa y malato deshidrogenasa) reaccionan con el acetato para producir oxalato y NADH, la actividad se determina como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 $\mu$ mol de acetato por minuto, método utilizado posteriormente por Tsigos *et al.*, 1995 y Martinou *et al.*, 1995. Por su parte Win *et al.*, en el 2001 determinaron la actividad enzimática mediante la cuantificación del acetato por cromatografía de gases, una unidad de actividad se definió como la cantidad de acetato producido durante 1h.

Debido a que la actividad de la enzima depende de condiciones tales como temperatura, pH, concentración del sustrato y tipo de enzimas, diversos trabajos han

estudiado estos parámetros. Como se mencionó anteriormente la mayoría de estas enzimas son termoestables por lo que las reacciones se llevan a cabo entre 45 - 50°C, el pH varía de acuerdo al tipo de microorganismo a partir del cual se extrajo la enzima y las concentraciones de sustrato en el medio se encuentran entre 1mg·ml<sup>-1</sup> – 10mg·ml<sup>-1</sup> de Buffer (Win *et al.*, 2001; Nahar *et al.*, 2005; Beaney *et al.*, 2007)

Hasta ahora los hongos más estudiados para la producción de CDA's han sido *Mucor rouxii* y *Colletotricum lindemuthianum*, este último debido a que el tipo de enzima que produce no se inhibe ante la presencia de acetato y es extracelular, representando una alternativa para su explotación a nivel industrial. Los métodos usados para la purificación de este tipo de enzimas se basan en la separación por  $M_w$  mediante ultrafiltración, fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico donde las principales columnas utilizadas son Q-sefarosa, F-sefarosa y cromatografía de exclusión molecular (Tsigos *et al.*, 1995; Martinou *et al.*, 1995; Win *et al.*, 2001).

#### 1.3.3.4 Modificaciones de quitina para favorecer desacetilación

A pesar de que las enzimas desacetilasas representan una opción al método químico de desacetilación, la aplicación de las mismas en la desacetilación de la quitina no ha sido suficientemente efectiva, ya que la insolubilidad de la quitina en los medios de reacción debido a su alta cristalinidad así como la poca accesibilidad de los grupos acetilos la hace resistente al ataque enzimático, por lo que sólo se ha logrado desacetilaciones periféricas (Aye *et al.*, 2006).

Pretratamientos en la quitina han sido necesarios para volver a este sustrato más accesible, se han estudiado modificaciones químicas y físicas para la producción de estructuras porosas y abiertas, que buscan ampliar el área de contacto y permitir una mayor penetración de la enzima, dentro de las modificaciones se encuentra la hidrólisis, preparación de suspensiones, desacetilación previa y precipitaciones (Aye *et al.*, 2006; Beaney *et al.*, 2007), La tabla 1.7 muestra modificaciones previamente estudiadas en los sustratos para favorecer la desacetilación enzimática.

**Tabla 1.8** Modificaciones en sustratos quitinolíticos para favorecer en la desacetilación enzimática

Tipo de modificación	Sustrato obtenido	Autor
Desacetilación química	Quitosanos altamente acetilados	Martinou <i>et al.</i> , 1992
Reacetilación de glicol quitosano	Glicol quitina	Tsigos <i>et al.</i> , 1995, Kaus <i>et al.</i> , 1998
Desacetilación química	Quitina parcialmente desacetilasa (PDC)	Tsigos <i>et al.</i> , 1996, Win <i>et al.</i> , 2000
Desacetilación química, sustitución química, solución de quitina en DMCA-LiCl y precipitación	Quitina (PDC), Quitosano carboximetilado + ácido succínico, quitina super fina,	Win <i>et al.</i> , 2001
Hidrólisis química y suspensiones con metanol-CaCl <sub>2</sub> precipitación	Quitina hidrolizada, quitina precipitada	Beaney <i>et al.</i> , 2007
Reacetilación de glicol-quitosano, desacetilación química	Glicol quitina, quitosano, beta quitina	Young-Ju <i>et al.</i> , 2008

## 1.4 Fermentación Acido láctica

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta que produce compuestos orgánicos. Cuando la célula se encuentra en condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de generar moléculas de NAD<sup>+</sup> que han sido reducidas durante la glucólisis para transformar la glucosa en ácido pirúvico y de esta manera continuar la reacción de producción de energía, por lo que es necesario reoxidar el NADH que cede sus electrones al ácido pirúvico y lo reduce a ácido láctico, ácido acético o etanol.

El proceso de fermentación donde el producto final es el ácido láctico (fermentación láctica) se lleva a cabo por bacterias lácticas (BL), hongos, protozoos y en tejidos animales.

### 1.4.1 Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas han sido utilizadas en la fermentación desde 4,000 años atrás, son microorganismos heterótrofos, gran positivas, ácido tolerantes, no forman esporas, son inmóviles, se encuentran en forma de cocos o bacilos con bajo

contenido de guanina y citosina, se caracterizan por producir ácido láctico a partir de hexosas, lo que las asocia a la conservación de alimentos pues la acidificación que producen inhibe el crecimiento de agentes que causan descomposición. Algunas BAL son productoras de bacteriocinas tóxicas que proporcionan un obstáculo adicional contra microorganismos patógenos. Las BAL son capaces de adaptarse a diversas condiciones, cambiando su metabolismo y de esta manera generar diferentes productos metabólicos (Axelsson, 1993). Los niveles y proporciones de estos productos, dependen de la especie del microorganismo involucrado, la composición química del medio y de las condiciones físicas que prevalecen durante el proceso de fermentación (Lindgren and Dobrogosz, 1990).

De acuerdo a los productos finales del metabolismo de la glucosa, se pueden distinguir dos principales rutas metabólicas de las BAL, los microorganismos que producen ácido láctico como único o mayor producto, se denominan Homofermentativos (ruta metabólica de Embden-Meyerhof) produciendo dos moles de ácido láctico y una ganancia neta de dos ATP por mol de glucosa consumido, aquellos que producen además del ácido láctico cantidades iguales de etanol, dióxido de carbono o ácido acético, (ruta metabólica de 6-fosfogluconato/fosfocetolasa) se denominan heterofermentativas donde se produce un mol de ácido láctico, etanol, CO<sub>2</sub> y un mol de ATP por mol de glucosa consumida (Axelsson. 1993) Figura 1.8. De esta manera, la producción de dióxido de carbono es una característica típica de la BAL heterofermentativa (Axelsson, 1993).

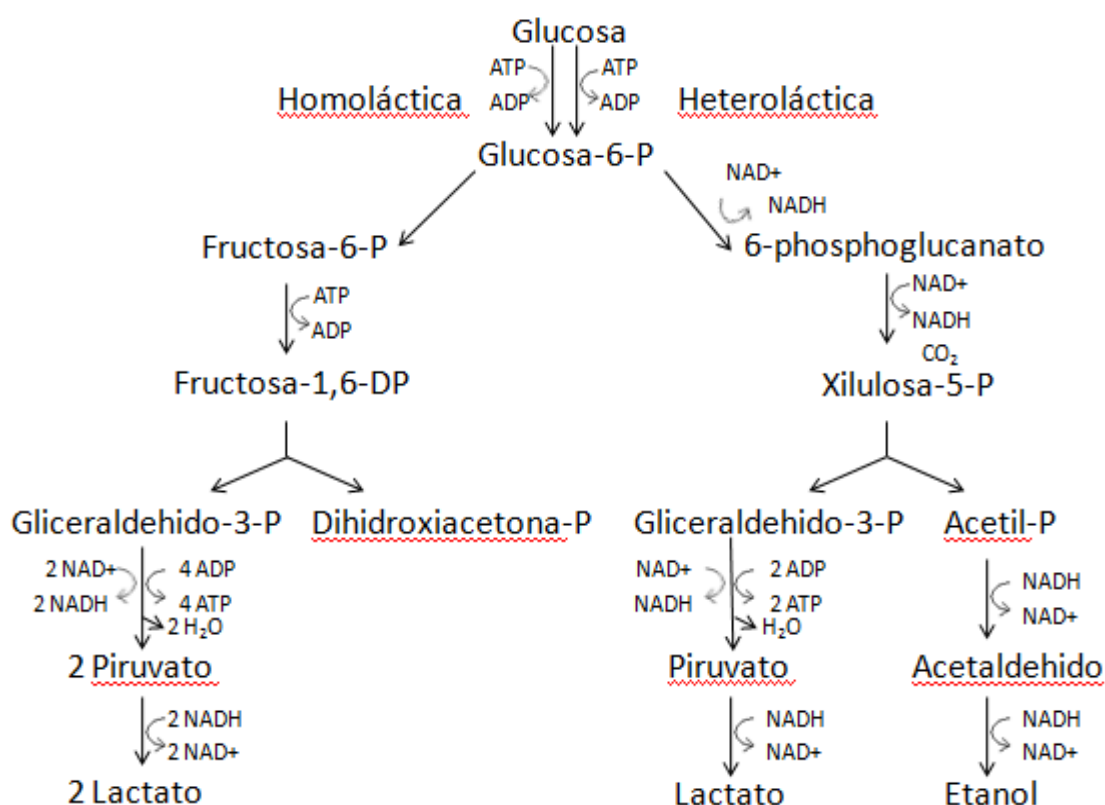
### 1.4.2 Condiciones de crecimiento

El carbono es el nutriente más importante para el crecimiento de las bacterias lácticas seguido del nitrógeno el cual es requerido para la síntesis de aminoácidos como la purina y pirimidina, también son indispensables el fósforo, magnesio y elementos traza.

La velocidad del proceso metabólico en las BAL varía en respuesta a las condiciones ambientales como el pH y la temperatura. La fermentación láctica es bastante sensible a la inhibición por producto (Friedman and Gaden, 1970), las enzimas reguladoras tienen una estabilidad limitada a pH y temperatura, esto se

debe a que son proteínas globulares, con enlaces no covalentes débiles y a medida que aumenta la temperatura o a pH extremos pierden actividad, convirtiendo a estos dos parámetros importantes en el proceso.

Generalmente las BAL son mesófilas pero pueden crecer entre un intervalo de 5-45°C con temperaturas óptimas que dependen de la especie, son tolerantes a condiciones ácidas y básicas lo que les permite crecer en intervalos de 3.2-9.6, siendo el óptimo entre 5 y 7 (Reddy *et al.*, 2008).



**Figura 1. 8** Esquema generalizado de la fermentación de la glucosa in bacterias ácido lácticas.

### 1.4.3 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido o también fermentación en estado sólido (FMS), se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos, o semi-sólidos, en ausencia de agua libre. Ésta técnica ha sido aplicada desde la antigüedad en la preparación de alimentos fermentados (Aidoo *et al.*, 1982). Las fermentaciones de



estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. El objetivo del proceso es el aumento parcial del contenido proteico de los alimentos, mejorando además las posibilidades de conservación, cambiando las características físicas y químicas, el color, el olor o el sabor de los mismos.

La fermentación en medio sólido utiliza generalmente un material natural como fuente de carbono y energía, además de presentar suficiente humedad para permitir procesos bioquímicos. Los sustratos utilizados deben proporcionar un buen ambiente de crecimiento de la flora microbiana y permitir la síntesis de las diferentes enzimas (Pandey *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.1 Aspectos generales de la fermentación en medio sólido**

Dentro de los aspectos más importantes para la fermentación en sólido se encuentran: la selección del microorganismos y sustrato adecuado, optimización de parámetros del proceso y el aislamiento y purificación del producto. El material sólido podría ser un sustrato sólido de origen natural, tales como los cultivos agrícolas, residuos agro-industriales o soportes inertes. Para la selección del sustrato hay que evaluar si se requiere un sustrato específico o si el objetivo es producir un producto específico de un sustrato adecuado. Los parámetros del proceso y su optimización son importantes así como parámetros físico-químicos y bioquímicos tales como: el tamaño de las partículas del sustrato, humedad inicial, el pH y pre-tratamiento del mismo, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y tamaño del inóculo, la suplementación de nutrientes, fuente de carbono e inductores, extracción de producto y depuración (Pandey *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.2 Otros aspectos y aplicaciones**

Los efectos de calor y transferencia de masa en los procesos de FMS, han sido consideradas como las principales dificultades, la acumulación de calor puede desnaturalizar el producto formado. La transferencia de oxígeno y temperatura del sustrato son también críticos, ya que afecta el crecimiento del microorganismo y la formación de producto. La actividad de agua ( $A_w$ ) del sustrato tiene una influencia determinante sobre la actividad microbiana. La  $A_w$  del medio se ha atribuido como

un parámetro fundamental para la transferencia de masa y solutos a través de las células microbianas. El control de este parámetro podría ser usado para modificar la producción metabólica o excreción de un microorganismo (Pandey *et al.*, 2003).

Las aplicaciones de la FMS se han centrado en el desarrollo de procesos biotecnológicos, como la biorremediación, biodegradación de compuestos peligrosos, desintoxicación biológica de residuos agro-industriales, biotransformación de cultivos y residuos de cosecha para el enriquecimiento nutricional, biopulping, y la producción compuestos con valor agregado. Los procesos de FMS ofrecen potenciales ventajas en la biorremediación y la desintoxicación biológica de los compuestos tóxicos y peligrosos (Pandey *et al.*, 2003).

---

# CAPÍTULO DOS:

## EFFECT OF TEMPERATURE ON CHITIN AND ASTAXANTHIN RECOVERIES FROM SHRIMP WASTE USING LACTIC ACID BACTERIA

*Capítulo publicado en Bioresource Technology (2009)100:2849-2854*

*(Los experimentos de extracción de astaxantina fueron realizados por la Lic. Jessica Yesemite Ramírez Hernández en su tesis de licenciatura en el Dpto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Ciudad Universitaria México DF)*

*Neith Pacheco, Mónica Garnica-González, Jessica Y. Ramírez-Hernández, Miquel Gimeno, Eduardo Bárzana y Keiko Shirai*

---

### **Abstract**

The chitin and astaxanthin recoveries by lactic acid fermentation of shrimp wastes (*Litopenaeus spp.*) were conducted in bed-column reactors at 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C. The response surface methodology showed that the fermentations carried out in the 27 to 36 °C temperature range with lactic acid above 0.319 mmol·g<sup>-1</sup> resulted in the highest demineralization. The maximal deproteinizations were attained from 30 to 40 °C. The extraction of free-astaxanthin did not present significant differences between 20 and 35 °C and the proportion of *cis*-stereoisomer forms increased with temperature. The growth rates of *Lactobacillus plantarum* were estimated in the 15 to 45 °C range and analyzed by Arrhenius and square root models. The cardinal values were 3.94 and 51.7 °C for minimum and maximum temperatures, respectively, with activation energy of 40 to 45 J·mol<sup>-1</sup>.

## 2.1 Introduction

Shrimp production has increased in the last decades from 30% to 80% in catch and aquaculture, respectively. The amount of waste can be up to 65% of the initial shrimp weight and it constitutes an environmental problem. The chitin content percentage (C%) in shrimp wastes (dry basis) varies from 14 to 30%. The percentage in weight of protein and mineral salts can be up to 40% and 35%, respectively (Synowiecki and Al-Khateeb, 2003). Moreover, these residues contain large amounts of pigments, mainly astaxanthin (Britton *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 2007) and the recovery and applications of such added value products is of increasing interest (Zakaria *et al.*, 1998; Cira *et al.*, 2002; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002; Synowiecki and Al-Khateeb, 2003).

Chitin and chitosan, its deacetylated form, are applied in water treatment, agriculture, textiles and dietary supplements, among many others (Synowiecki and Al-Khateeb, 2003; Rangel-Mendez *et al.*, 2009). The industrial production of chitin, mainly from crab or shrimp wastes, is based on successive chemical treatments with highly concentrated alkali and acid solutions, which involve relatively high energy consumption and the generation of undesirable and corrosive side products, as well as the use of large quantities of water. Chitin quality might also be diminished by depolymerization and astaxanthin is degraded under such operational conditions (Synowiecki and Al-Khateeb, 2003). Alternatively, some efforts have been directed towards the reduction of chemical treatments in a more eco-friendly processes such as bacterial fermentations, e.g. lactic acid fermentations (LAF), to reduce the use of alkali and acids (Zakaria *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007). Generally, the application of non-aggressive processes, such as LAF, enhances the astaxanthin recovery as it is a very sensitive compound (Gimeno *et al.*, 2007). Astaxanthin is a xanthophyll that has been reported as an excellent anti-oxidant and anti-carcinogenic, as well as retina precursor, and skin protector, which can be used in a wide range of applications, such as in aquaculture, food colorant and cosmetics (Gimeno *et al.*, 2007; Bhaskar *et al.*, 2007). The use of renewable sources to obtain astaxanthin is of increasing economical interest as an alternative to the synthetic production of pigments (Britton *et al.*, 1997). Therefore, the recovery of astaxanthin by simple extraction from shrimp wastes may be

profitable along with the obtaining of other added value compounds (Britton *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 2007).

The growth of lactic acid bacteria (LAB) occurs usually between 10 and 50 °C, i.e. *Lb. plantarum* grow at 30 °C in culture media (Carr *et al.*, 2002). Herein, the LAF temperature for shrimp wastes have been studied and the demineralization ( $D_{\text{MIN}}\%$ ) and deproteinization ( $D_{\text{PROT}}\%$ ) percentages in the solid fraction are determined as crucial parameters for the chitin and astaxanthin purification. In addition, the acidification process in its relation with  $D_{\text{MIN}}\%$  is described by the use of response surface methodology (RSM). The astaxanthin contents as well as the proportion of *cis*- and *trans*- stereoisomers were determined in the extracts from each LAF. The influence of temperature in LAB growth rates in shrimp wastes are also reported with the use of Arrhenius and square root models.

## 2.2 Materials and methods

### 2.2.1 Materials

Shrimp wastes were composed of a mixture of cephalothoraxes of the species *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylostris* and *Litopenaeus setiferus* obtained from the central seafood market in Mexico City (Mexico). The wastes were minced in a meat mincer (Torrey 32-3, Mexico) to a particle size of 5 mm and stored at -20 °C. Commercial astaxanthin standard (all-*trans* isomer, 98% purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Mexico) and stored at -78 °C. Chloroform and acetone (Technical grade) were purchased from Casa Miyako (Mexico) and used as received. *Lactobacillus plantarum* was cultivated and maintained in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar at 30 °C. The inoculum was prepared by deposition from the bacterial slants in MRS broth incubated at 30 °C for 24 h up to a count of  $10^8$  colony forming units per milliliter (CFU·mL<sup>-1</sup>).

### 2.2.2 LAF conditions

The LAF procedure was similar to that reported by Cira *et al.* (2002). Sucrose (10 wt/wt %) and the starter (5 vol/wt %) were added to the shrimp waste, mixed and placed into the reactor. In a typical procedure, 3.5 kg of this mixture was placed into a column reactor. Each reactor consisted of two connected stainless steel modules open to air with lids and equipped with an acrylic mesh plate, porous size of 4 mm,

between the modules. The reactor was supplied with a gas outlet attached to an activated carbon filter column. The dimensions of the stainless steel reactor upper module, where fermentation takes place, were 31 cm length and 11 cm of internal diameter. Length and diameter of the lower module that will contain the liquor with the minerals and proteins solvated were 10.5 cm and 11 cm, respectively. The reactors were incubated up to 144 h at several operational temperatures (15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C). Sample aliquots were withdrawn from the bottom and top modules, which contained the liquid and solid fractions, respectively, every 24 h for further analyses.

### **2.2.3 Analyses of samples**

#### **2.2.3.1 Determination of pH and total titratable acidity**

The pH was determined from the liquid fractions using a potentiometer (pH 210 HANNA, Italy). The total titratable acidity (TTA) was determined by potentiometric titration with NaOH (0.1N) to a final pH of 8.0 and expressed as lactic acid (LA) in samples diluted in distilled water in a 1:10 (wt/vol) ratio (A.O.A.C., 1980) thus considering that the starter, *Lb. plantarum*, is homofermentative lactic acid bacteria (Carr *et al.*, 2002).

#### **2.2.3.2 Determination of LAB growth**

The growth of LAB on fermented shrimp wastes was determined by colony enumeration using MRS agar. The sample (10 g) was homogenized in 90 ml of a saline solution at 0.09 wt/wt % for 2 min, further decimal dilutions were prepared. The results were expressed as CFU·ml<sup>-1</sup>.

#### **2.2.3.3 Determination of moisture, ash, protein, chitin (C%) contents, D<sub>PROT</sub>% and D<sub>MIN</sub>%**

The moisture contents were determined in the raw shrimp wastes and solid fractions from the LAF. The samples (1 g) were dried for 12 hours at 105 °C and then cooled to room temperature prior to weight. The moisture content was calculated by weight difference from the raw and fermented samples before and after the drying process following the A.O.A.C. method. Then, the dried samples were placed in an oven at 550 °C for 12 h to quantify ash (A.O.A.C., 1980).

The total nitrogen contents were measured by Kjeldahl in an automated apparatus (Buchi, Switzerland). The nitrogen content in chitin was obtained from a sample of purified chitin by acid and alkali treatments according to Black and Schwartz (1950). Corrected protein contents were calculated by the subtraction of the chitin nitrogen to the total nitrogen content and multiplied by 6.25.

$D_{\text{PROT}}\%$  and  $D_{\text{MIN}}\%$  (Y) were obtained using the equation 2.1.

$$Y(\%) = \frac{[(X_0 \times S_0) - (X_R \times S_R)]}{X_0 \times S_0} \times 100 \quad (2.1)$$

where:  $X_0$  and  $X_R$  are the protein or ash content percentages in raw and fermented samples, respectively.  $S_0$  and  $S_R$  are raw and fermented samples weights (g), respectively.

#### 2.2.4 Modeling the growth of LAB and acidification

Bacterial growth and acidification rates were estimated by the Gompertz model using the non-linear regression program (STATISTICA (StatSoft, Inc)), the model was selected to the sigmoidal behavior of the data obtained, according to the equation 2.2.

$$y(t) = a \exp\left(-b \exp(-kt)\right) \quad (2.2)$$

where:  $y(t)$  is the LA produced (TTA in  $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) or log of CFU/ml at time (t);  $a$  is the maximum product concentration ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) or log of CFU/ml at  $t \rightarrow \infty$ ;  $b$  is a constant related to the initial conditions when  $t=0$ , then  $y(t) = y_0 = a \exp(-b)$ ;  $k$  is the acidification rate constant or bacterial growth rate ( $\text{h}^{-1}$ ). The maximum rate of acid production ( $V_{\text{max}}$ ) was calculated from parameters of the model as  $V_{\text{max}} = 0.368ak$  (see anexos section A1.b).

##### 2.2.4.1 Estimation of the activation energy ( $E_A$ ) of bacterial growth and its cardinal values of temperature

The effect of temperature on the growth rate ( $k$ ) of LAB was evaluated with the Arrhenius equation 2.3 in order to estimate the  $E_A$ .

$$k = Ae^{-E_A/RT} \quad (2.3)$$

Where:  $k$  is the growth rate determined by equation 2.2;  $T$  is the absolute temperature ( $^{\circ}K$ );  $A$  and  $R$  are constants (Ratkowsky *et al.*, 1983).

The square-root relationship proposed by Ratkowsky *et al.* (1983) was used to obtain the minimum ( $T_{min}$ ) and maximum ( $T_{max}$ ) temperature bounds for the predicted growth of the culture that describes the entire temperature range following the equation 2.4.

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{min}) \{1 - e[c(T - T_{max})]\} \quad (2.4)$$

where: The parameter  $b$  is the regression coefficient of the square root of growth rate constant versus temperature ( $^{\circ}K$ ) below the optimal temperature and  $c$  is an additional parameter to enable the model to fit the data for temperatures above the optimal temperature.

### 2.2.5 Effect of temperature and TTA on $D_{MIN}\%$ by RSM

RSM was applied to estimate the optimum LAF temperature and TTA on the  $D_{MIN}\%$  of the shrimp waste using the statistical program NCSS (NCSS, PASS and GESS, 2001).

The independent variables of the experiment, temperature and TTA, were centered and normalized according to the equation 2.5.

$$X = \frac{x - \left[ \frac{(x_{max} + x_{min})}{2} \right]}{\frac{(x_{max} - x_{min})}{2}} \quad (2.5)$$

Where  $X$  is the centered/normalised value,  $x$  is the experimental value and  $x_{max}$  and  $x_{min}$  are the maximum and minimum values of the independent variables, respectively (Choorit *et al.*, 2007).

Subsequently, the experimental data were fitted into a second-order model by the equation 2.6.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j<i} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (2.6)$$



Where  $y$  is the predicted response  $D_{\text{MIN}}\%$ ;  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  are regression coefficients of the model for the intercept, linear, squared and interaction effect, respectively and  $X_i$ ,  $X_j$  are the centered/normalized independent variables. Three-dimensional surface plots were generated to depict the effect of the independent variables (temperature and lactic acid production) on the  $D_{\text{MIN}}\%$  by software Mathematica version 6.0.0 (Wolfram Inc., USA 2007).

## 2.2.6 Determination of free-astaxanthin by high performance liquid chromatography (HPLC)

The determination of free-astaxanthin contents in the solid fractions of the LAF (144 h) was carried out by acetone extractions following a previously reported method (Gimeno *et al.*, 2007).

### 2.2.6.1 Determination of stereoisomer percentages by HPLC

The method of identification and quantification of the all *trans*-astaxanthin and *cis* stereoisomer percentages was based on an earlier report by Yuan and Chen (1999). The method was validated as follows; a known weight of standard astaxanthin (all *trans*-astaxanthin 98% purity, Aldrich) was dissolved in chloroform and stirred at 37 °C in the absence of light. Aliquots were withdrawn at time intervals for analyses up to 40 h. The chloroform was removed from the samples by flushing nitrogen and the solid contents were re-dissolved in known volumes of methanol:ethyl acetate:acetonitrile:water (80:10:5:5). The partial conversion of the standard astaxanthin all *trans*-isomer into *cis*-isomers was monitored by an HPLC (HP1100 series, Hewlett-Packard, USA) equipped with a photodiode array detector (DAD) using a column X-terra RP-C18 (Waters, Inc. USA) with methanol:acetonitrile:ethyl acetate:water (70:10:10:10) mobile phase in a 0.7 ml/min flow. This method was used for the determination of the free-astaxanthin all-*trans* and *cis* percentages in samples from the LAF acetone extracts (Gimeno *et al.*, 2007). The percentages of stereoisomers were obtained by integration of the corresponding areas in the chromatograms.

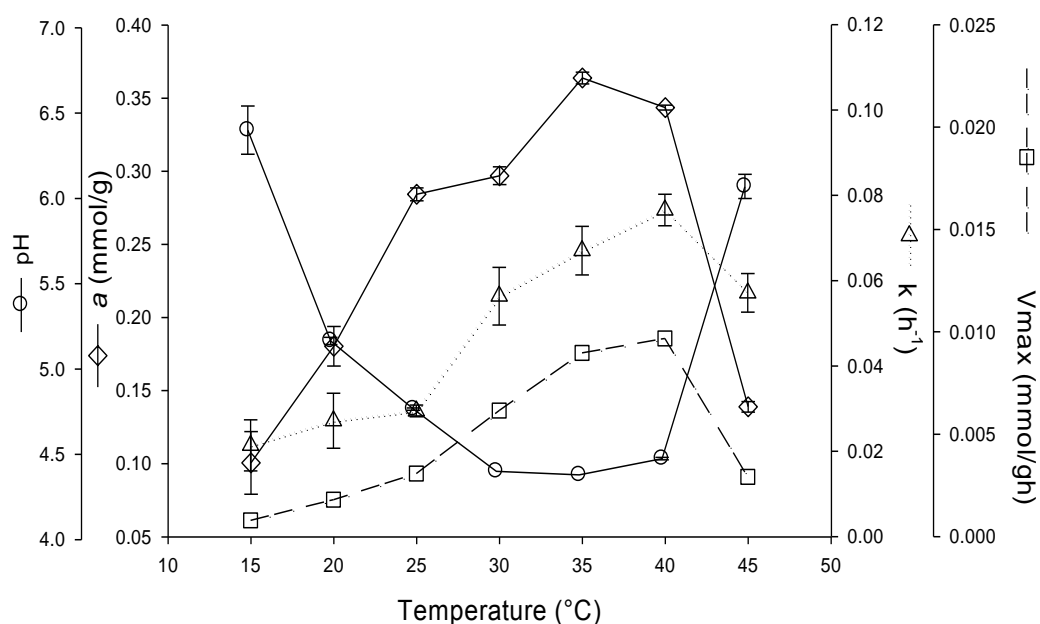
## 2.2.7 Statistical analyses

The data were subjected to analyses of variance and multiple comparison of means by Tukey Kramer test in order to determine significant differences among temperatures ( $p < 0.05$ ) using the statistical program NCSS (NCSS, PASS and GESS, 2001).

## 2.3 Results and discussion

### 2.3.1 pH, TTA and acidification kinetics

The changes in pH and TTA in the liquid fractions of each LAF showed parabolic curves with maximums between 30 and 40 °C (Figure 2.1), which clearly indicates a remarkable influence of the temperature in the fermentation. The shrimp waste decomposition was prevented at 25-40 °C temperature range where the pH values were kept lower than 5.



**Figure 2. 1** The kinetic parameters of acidification estimated by Gompertz model (Equation. 2.1) and final pH values obtained in the liquid fraction after 144 h of LAF of shrimp wastes at different temperatures.

The measured LA, expressed as TTA, during the time course of the LAF were adjusted to the Gompertz model with  $R^2 \geq 0.96$ . The estimated acidification parameters, shown in Figure 2.1, indicate that the highest maximum product concentration ( $a$ ), acidification rate ( $k$ ) and maximum rate of acid production ( $V_{max}$ ) were attained from 35 to 40 °C.

### 2.3.2 $D_{MIN}\%$ , $D_{PROT}\%$ and $C\%$ in LAF products

The effect of the two independent variables, temperature ( $X_1$ ) and TTA ( $X_2$ ), on the  $D_{MIN}\%$  ( $Y$ ) was evaluated by RSM. The variables were coded and fitted to a second order polynomial function by multiple regression analysis. The model that explained the influence of temperature and TTA on the  $D_{MIN}\%$  is indicated in the following equation 2.7 and the estimated coefficients, standard errors and p-values obtained from the experimental data are shown in Table 2.1.

$$Y = 50.160 + 11.716X_1 + 51.076X_2 - 61.076X_1^2X_2 - 27.358X_1^2 \quad (2.7)$$

**Table 2.1** Estimated coefficients, standard errors, t- and p- values for the model according to the model 2.7.

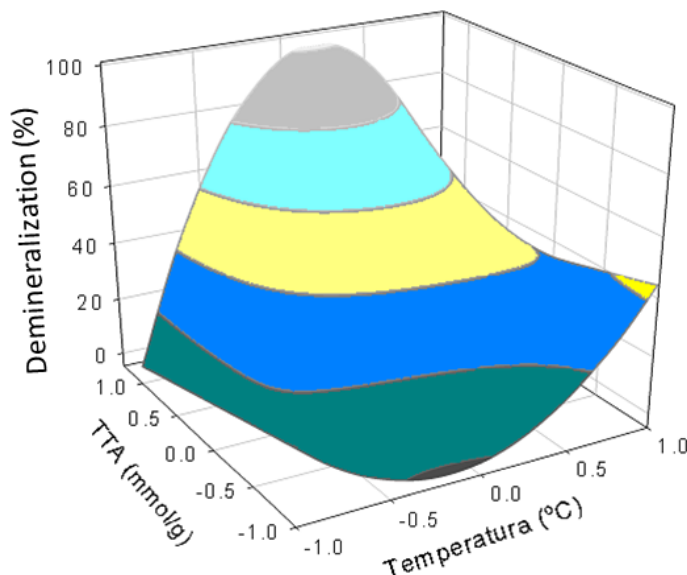
Variable	Estimated Coefficient	Standard Error	t-Value	p-Value
Constant	50.160	4.517	11.104	< 0.001
$X_1$	11.716	2.623	4.467	0.002
$X_2$	51.076	6.701	7.623	< 0.001
$X_1^2$	-27.358	6.333	-4.320	0.002
$X_1^2 \cdot X_2$	-61.076	7.247	-8.428	< 0.001

$R=0.993$ ,  $R^2=0.986$

$X_1$  and  $X_2$  are the coded values of temperature and TTA, respectively

According to the regression analysis the values of the quadratic model were significant ( $p < 0.001$ ) with determination and multiple correlation coefficients,  $R^2$  and  $R$ , respectively, higher than 0.98 (Table 2.1). The three-dimensional surface plot, shown in Figure 2.2, indicates that the LAF temperatures between 27 and 36 °C with

a TTA above 0.319 resulted in a  $D_{\text{MIN}}\%$  higher than 94%. It is worth mentioning that relatively large porous mesh plate (4 mm) increased the  $D_{\text{MIN}}\%$  as compared to the previous work by Cira *et al.* (2002) where a porous mesh of 1 mm was used.

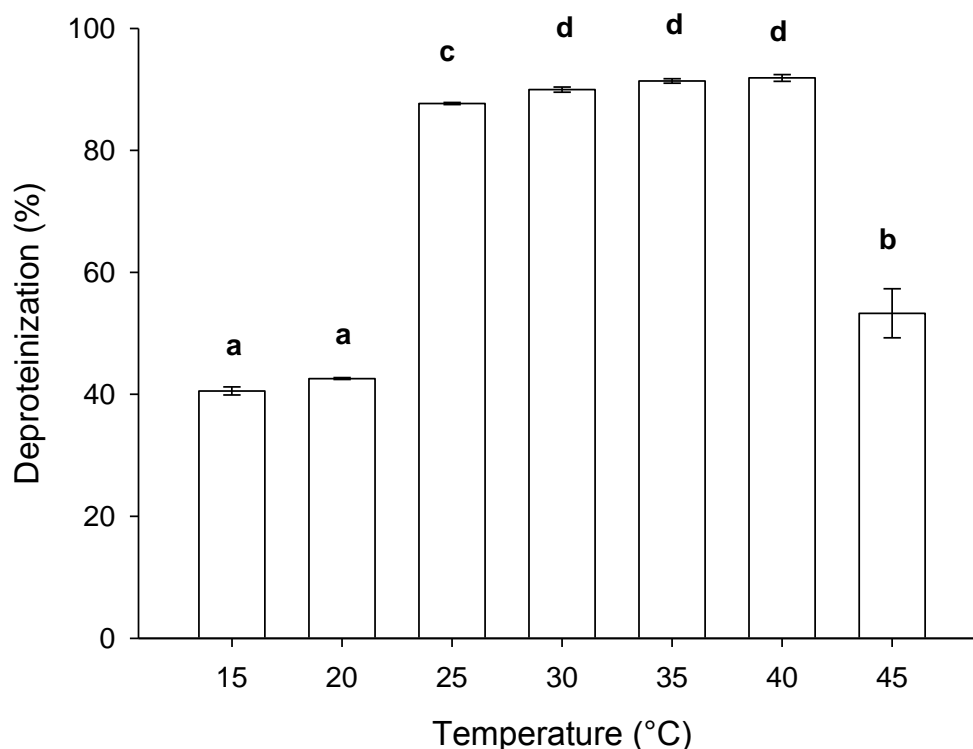


**Figure 2. 2** Three dimensional plot of  $D_{\text{MIN}}\%$  as a function of TTA expressed as LA (mmol/g) and temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) during LAF of shrimp wastes.

These experimental evidences were attributed to the fast mineral removal from the solid fraction, thus the mesh size reported herein favors the separation of the liquids rich in soluble minerals. Additionally, TTA displayed a significant effect alone or in combination with temperature in a quadratic RSM with up to 80% of  $D_{\text{MIN}}$  and without the addition of organic acids, which constitutes an improvement of the process (Rao *et al.*, 2000; Bhaskar *et al.*, 2007).

The maximal  $D_{\text{PROT}}\%$  of  $89.97 \pm 0.017$ ,  $91.38 \pm 0.38$ ,  $91.87 \pm 0.55$  were determined at 30, 35 and 40  $^{\circ}\text{C}$ , respectively, which agrees with the optimum LAB growth shown in Figure 2.3. These experimental evidences confirm the activity of *Lb. plantarum* proteases as reported by Matthews *et al.* (2004) in other substrates. Whereas, the observed  $D_{\text{PROT}}\%$  at 15  $^{\circ}\text{C}$  ( $40.55 \pm 0.67\%$ ) and 20  $^{\circ}\text{C}$  ( $42.58 \pm 0.16\%$ ), when low LAB growth, might be explained by the presence of digestive enzymes in the hepatopancreas, including trypsin, cathepsin, collagenase chymotrypsin and elastase (Oh *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2005). Besides, peptidases and proteinases in

digestive systems of decapods have been studied by García-Carreño *et al.* (1994) with optimal activities found at neutral pH, but showing trypsin, chymotrypsin and collagenase activities in a wide pH range (5-8). Therefore,  $D_{\text{PROT}}$  could be partially attributed to such proteolytic enzymes considering the values attained during LAF at temperatures with low bacterial growth (15 and 20°C). The  $D_{\text{PROT}}\%$  attained in LAF at 45 °C ( $53.28 \pm 4.02\%$ ) despite of the low LAB growth may be a consequence of the protein degradation at such operational conditions, which resulted in their partial hydrolysis due to the growth of other undesired thermophilic microflora (Figure 2.3).



**Figure 2. 3** Deproteinization percentage determined in the solid fractions after 144h of LAF of shrimp wastes at different temperatures.

The maximum  $D_{\text{PROT}}\%$  obtained in this work (91%) improved that attained by Cira *et al.* (2002) (87.6%), which is attributed to the higher proteolytic activity owing to the optimum operational temperature and larger size of mesh plate than the earlier report. In a related work, Rao *et al.* (2000) claimed  $D_{\text{PROT}}\%$  values from 66% to 91% with LAF combined with the addition of several acetic and citric acid concentrations, however they observed that the highest  $D_{\text{PROT}}\%$  resulted in a decrease in  $D_{\text{MIN}}\%$ . Similarly, recent studies with LAF using shrimp wastes in water (1:1) showed  $D_{\text{PROT}}\%$  as high as 96% but also relatively low  $D_{\text{MIN}}\%$  of 72% (Bhaskar *et al.*, 2007).

The C% in the initial shrimp waste was 30.2%, whereas after LAF, C% was as high as 70-74% at 30 and 35 °C. The protein content decreased in the LA fermented shrimp wastes from 25 to 40 °C, whereas ash contents were significantly low from 30 to 35 °C (Table 2.2) in agreement with the observed  $D_{\text{PROT}}\%$  and  $D_{\text{MIN}}\%$ .

These experimental evidences indicate an adequate biological chitin recovery by LAF of shrimp wastes at an adequate operational temperature owing to both high  $D_{\text{MIN}}\%$  and  $D_{\text{PROT}}\%$  attained in the product, as well as its preservation and recovery of other added value compounds.

**Table 2.2** Proximate composition of non fermented shrimp wastes (raw) and LA fermented after 144 h at several temperatures.

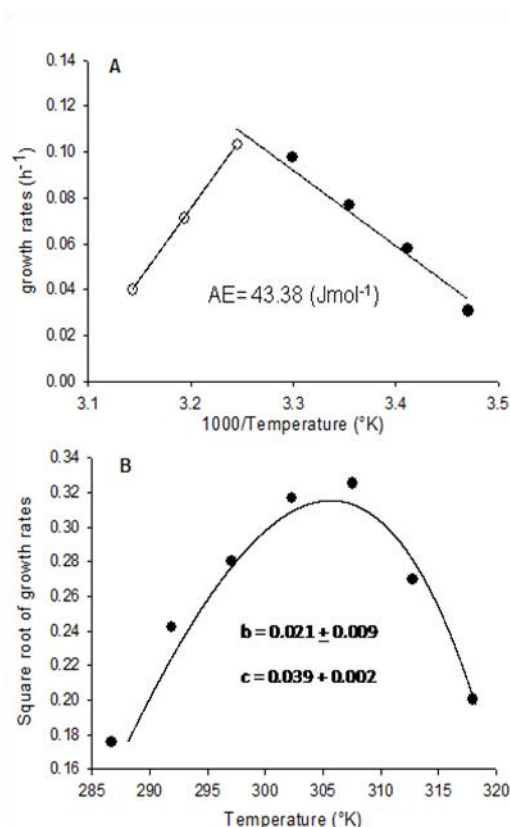
Temperature (°C)	Protein content (%) <sup>*</sup>	Ash content (%) <sup>*</sup>	Chitin content (%) <sup>*</sup>
Raw	30.23 ± 0.18 <sup>d</sup>	29.94 ± 1.36 <sup>d</sup>	30.2 ± 0.56
15	21.60 ± 0.24 <sup>c</sup>	29.94 ± 1.36 <sup>d</sup>	48.04 ± 0.4 <sup>a</sup>
20	22.21 ± 0.06 <sup>c</sup>	26.08 ± 0.16 <sup>c</sup>	61.2 ± 0.02 <sup>c</sup>
25	11.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	25.17 ± 0.94 <sup>c</sup>	63.68 ± 0.1 <sup>de</sup>
30	9.51 ± 0.41 <sup>a</sup>	20.40 ± 0.76 <sup>b</sup>	70.09 ± 0.82 <sup>f</sup>
35	7.72 ± 0.33 <sup>a</sup>	18.21 ± 0.40 <sup>a</sup>	74.07 ± 0.33 <sup>g</sup>
40	8.91 ± 0.61 <sup>a</sup>	26.08 ± 1.17 <sup>c</sup>	65.02 ± 0.61 <sup>e</sup>
45	21.01 ± 1.80 <sup>c</sup>	29.46 ± 0.31 <sup>d</sup>	58.93 ± 0.77 <sup>b</sup>

\*Mean of duplicates. Values in a column with the same letter were not significantly different at  $p < 0.05$  determined by multiple comparisons of means by Tukey Kramer's test.

### 2.3.3 Determination of LAB

The CFU was adjusted to the Gompertz model following the equation 2. The growth rate increased from 15 to 35 °C until  $0.103 \text{ h}^{-1}$  and then it decreased at 40 and 45 °C. Furthermore, the dependence of the growth rate upon temperature was modeled by the Arrhenius equation. The  $E_A$  obtained for LAB was  $43.38 \text{ J.mol}^{-1}$  and the optimum growth rate temperature was observed at 35 °C with a rapid acidification of the media

(Figure 2.1), thus the risk of putrefaction by spoilage microorganisms is reduced. *Lactobacillus plantarum* is a mesophilic bacteria responsible of food spoilage with an optimum temperature of 30 °C and a  $T_{\max}$  and  $T_{\min}$  estimated by Ratkowsky model in MRS broth of 317.96 °K (44.8 °C) and 276.45 °K (3.29 °C), respectively (Zwietering *et al.*, 1994). Similarly, our LAB cardinal values in the LAF of shrimp wastes were  $T_{\max} = 324.85 \text{ °K} \pm 1.37$  (51.69 °C) and  $T_{\min} = 277.1 \text{ °K} \pm 2.52$  (3.94 °C) (Figure 2.4).



**Figure 2. 4** Effect of temperature on growth rate of LAB in shrimp wastes: A) Arrhenius plot and B) square root model.

### 2.3.4 Quantification of astaxanthin in the fermented shrimp wastes

The quantification of free-astaxanthin in the acetone extracts from the solid fractions of the fermented shrimp wastes is shown in Figure 2.5. The maximum free-astaxanthin content was observed between 20 and 30 °C without significant differences (see HPLC chromatograms in section Anexos A3).

The LAF carried out at 40 and 45 °C showed a significant decrease in free-astaxanthin as assessed by HPLC analyses, which well may indicate partial degradation of this carotenoid during such fermentation conditions (Gimeno *et al.*,

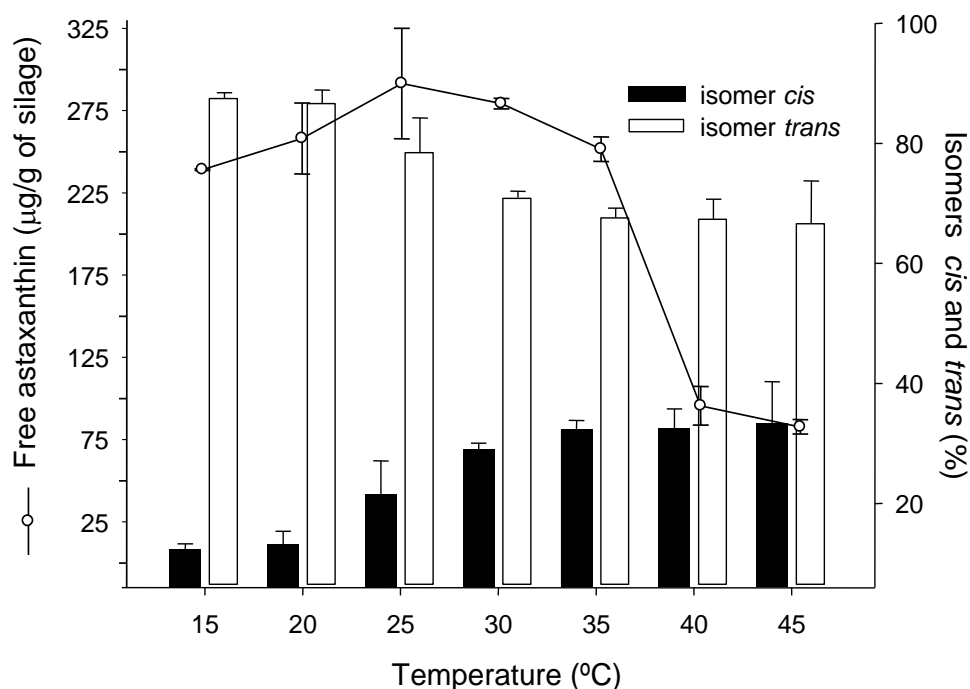
2007). The optimum  $D_{\text{PROT}}\%$  in the LAF ranged between 30 and 40 °C, which are prompted to favor the release of the carotenoid in the form of complexes with protein or fatty acids. However, the increase in temperature has the opposite effect of degradation of this xanthophyll and therefore, a plausible explanation on the basis of these results would be in an interplay between temperature and  $D_{\text{PROT}}$ .

#### 2.3.4.1 Evaluation of *cis/trans* astaxanthin isomerization in LAF by HPLC-DAD

The isomerization of the astaxanthin standard (all *trans*-astaxanthin) resolved into two new peaks on the HPLC chromatograms with retention times of 5.3 min and 5.7 min corresponding to *cis*-isomers (see Anexo A4 for HPLC chromatograms of the astaxanthin isomers in the LA fermented samples). The *cis* peak at 5.3 min presented an absorption band centered at 476 nm and the latter displayed a larger spectral shift resolved into two bands centered at 470 nm (large) and at 372 nm (small), which according to Yuan and Chen (1999) were assigned to 9 *cis*-astaxanthin and 13 *cis*-astaxanthin, respectively. Subsequently, the same HPLC-DAD analyses were applied to LAF samples evidencing the presence of both 9-*cis* and 13-*cis* forms along with all *trans*-astaxanthin in the shrimp wastes (see Anexo A5 for UV-spectra from the HPLC-DAD of astaxanthin isomers in the LA fermented samples).

The variations of the isomer percentages with LAF temperature in the extracts are shown in Figure 2.5. The highest proportions of all *trans*-astaxanthin stereoisomer were observed in samples from low LAF temperatures (15 and 20 °C), which may be directly related to the minimized carotenoid isomerization in such operational conditions, whereas the percentage of *cis* isomers tend to increase with temperature. This might be explained due to the readily isomerization of the all-*trans* natural astaxanthin to *cis* unhindered isomers as it has been reported elsewhere (Johnson and An, 1991; Yuan and Chen, 1999; Mortensen and Skibsted, 2000). The isomerization is promoted by steric reasons since 9 and 13 *cis* isomers are more stable than all-*trans* and this might occur with shifts of temperature, as well as exposure to light, treatment with metal ions or using medium strength acids, such as trifluoroacetic acid, in organic solvents.





**Figure 2. 5** Free-astaxanthin content (-○-) and proportion of the mixture of 9 and 13-*cis* astaxanthin (■) and all *trans*-astaxanthin (□) isomers in the acetone extracts from the solid fractions of the LAF at different operational temperatures.

Therefore, the influence of the LAF temperature produced configurational changes in astaxanthin which determination is worth for further applications. Liu *et al.* (2007) reported higher antioxidant capacity with *cis*-isomers, specially the 9-*cis*, than the all *trans*-isomer. Then, the presence of *cis* double bonds may be preferred in cosmetics or pharmaceutical applications. However, other authors claimed improved digestibility and pigmentation in salmon and trout with pure all *trans*-isomer compared to *cis/trans* mixtures (Bjerkeng and Berge, 2000), and according to our results (Figure 2.5), the astaxanthin recovery at the lowest LAF temperatures would be most adequate for animal feed.

## 2.4 Conclusions

The operational temperature displayed an important effect on the  $D_{MIN}\%$  and  $D_{PROT}\%$  in the LAF of shrimp waste. The obtained model makes feasible to predict the  $D_{MIN}\%$  according to the amount of TTA and temperature. Temperatures among 30 to 40 °C

were considered as the optimum for biological chitin purification. However, it is important to consider that the highest free-astaxanthin recovery was attained in LAF conducted in the 20 to 30 °C temperature range and the proportion of *cis*-isomers increased with fermentation temperature.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully thank to CONACYT (Projects No. 46173 and No. 48641) for the research funding and for the PCP-Programme (NP).

---

# CAPÍTULO TRES:

## CHITIN EXTRACTION AND CHARACTERIZATION FROM SHRIMP WASTE (*Litopenaeus vanameii*), CHEMICAL AND ENZYMATIC DEACETYLATION

---

### 3.1 Objectives

In this chapter the LAF of shrimp waste (*Litopenaeus vanameii*) as biological method for chitin and astaxanthin recoveries was evaluated. Proteolytic activity, protein and mineral elimination were determined during fermentation. Characterization of  $M_w$  and DA were determined in fermented products and biologically purified chitin to compare with a chemically purified chitin, subsequent chemical deacetylation was carried out.

Production and partial purification of CDAs from liquid culture of *Colletotrichum gloeosporioides* were evaluated. Enzyme and substrate concentration, reaction time and kinetics parameters as  $K_M$  y  $V_{MAX}$  with reacylated chitosans (DA of 60%) were determined. Partial purified extract was also evaluated on the deacetylation of different chitin and chemically and physically modified chitins as substrates.

## 3.2 Introduction

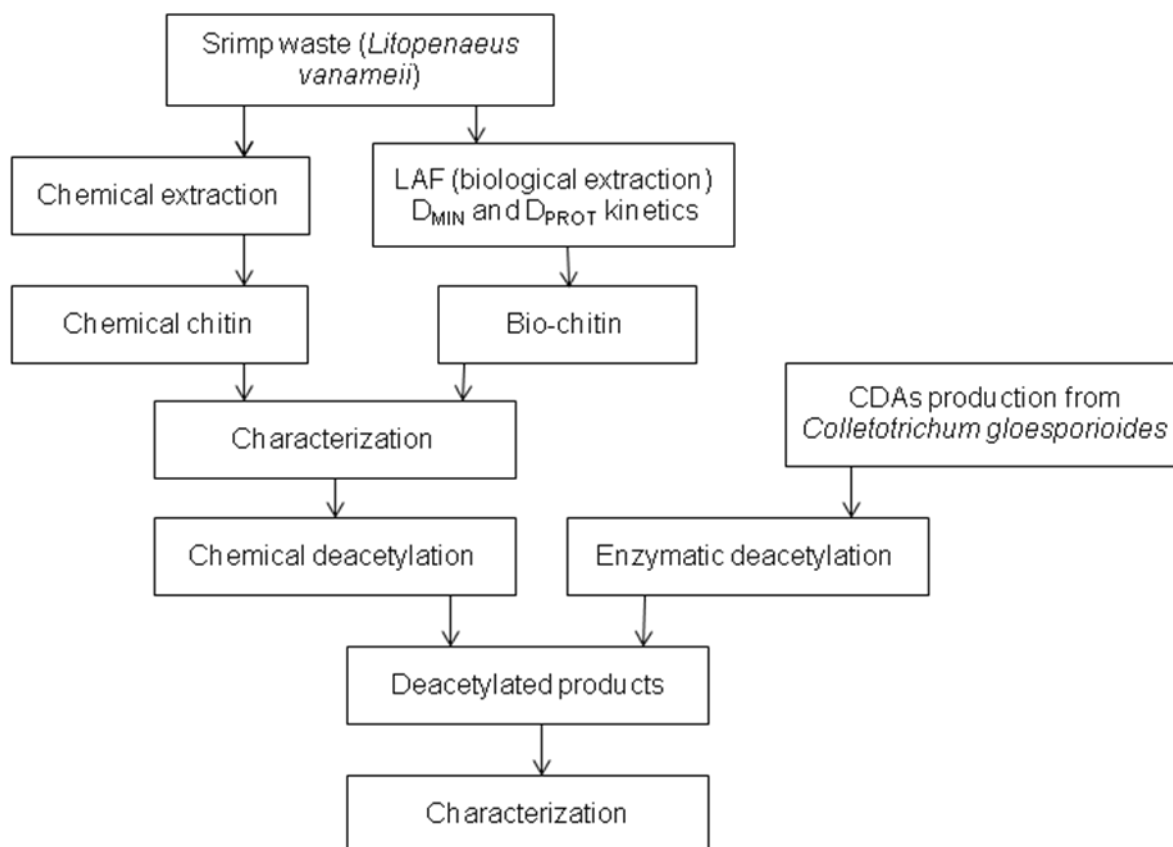
Chitin is present in crustacean shells as ordered crystalline micro fibrils forming a complex structure with proteins, minerals and lipids (Rabaae *et al.*, 2005). The proportion of these components varies according to the species, part of the organism, season age, gender, state of their nutrition and environmental conditions (Shahidi, 2005). Chitin exists in three polymorphic forms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), being  $\alpha$ -chitin the most common structure (Minke, 1978). The  $\alpha$  disposition is responsible of an extensive crystallinity that contributes to the strength shown by chitinous structures (Prashanth and Tharanathan, 2007).

The pacific white shrimp (*Litopenaeus vannameii*) is the most cultivated specie in North America. Mexico produces ca. 35,000 tons per year, which 40 to 60% correspond to wastes that constitute an attractive raw material for the extraction of chitin. Commercial chitin is chemically isolated with the use of high concentrations of strong acids or bases, this procedure implies the use of relatively high energy consumption, generation of undesirable corrosive side products and it is responsible of an important reduction in chitin molecular weights (Shirai *et al.*, 2001; Shahidi 2005). LAF is an alternative to the chemical method due to the solubilization of calcium carbonate by the *in situ* LA production and the proteolytic activity generated by endogenous and microbial proteolytic enzymes (Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007). The effective elimination of minerals and proteins from the shrimp waste during the biological process depends on fermentation parameters, acidification process, proteolytic activity and fermentation time (Rao *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2009).

Chitosan is essentially produced by chemical *N*-deacetylation of crustacean chitin. Conditions such as temperature, alkali concentration, processing time, properties of raw materials, source and isolation method, affects chitosan characteristics (Hwang *et al.*, 2002; Synowiecki *et al.*, 2003). Chemical deacetylation can be carry out in a heterogeneous or homogeneous way, the first one is conducted at high temperature during a short period of time performed more rapidly in amorphous regions of the polymer than in the crystalline areas, with high degree of deacetylation, but reduction

in the size of the molecules. In homogeneous deacetylation, relatively low temperatures and extended deacetylation are used, with the production of a random distribution of deacetylated residues in chitosan samples (Nemtsev *et al.*, 2002; Synowiecki *et al.*, 2003). Several studies have been conducted to prevent chain degradation (Rudrapatnam *et al.*, 2003), the use of N<sub>2</sub> to reduce oxygen concentrations (Rudrapatnam *et al.*, 2003), heterogeneous deacetylation with Freeze-Pump-Thaw (FPT) cycles that favors NaOH penetration into the molecules and avoiding depolymerization (Lamarque *et al.*, 2005). Due to chemical chitosan production is a process environmentally unsafe and not easily controlled leading to a broad range of heterogeneous products, different alternatives have been suggested (Tsigos *et al.*, 2000). Enzymatic chitosan production is a controlled, non degradative and well defined process that overcomes most of the disadvantages of the chemical method (Tsigos *et al.*, 2000). Chitin-deacetylases (CDAs) have attracted increasing interest owing to its possible applicability for preparation of specific chitosans oligomers and polymers from chitin or pretreated chitin (Young-Ju *et al.*, 2009). CDA's are glycoproteins with molecular masses ranging from 24 to 150 g.mol<sup>-1</sup>. In all cases the optimum temperature for enzyme activity is 50°C while optimum pH varies from 4.5 to 8.5 (Young-Ju *et al.*, 2009; Aye *et al.*, 2006). Chitin deacetylases have been reported in several fungi as *Mucor roxii*, *Colletotrichum lindemuthianum* (Tsigos and Bouriotis, 1995), *Absidia coerulea* (Win *et al.*, 2001) and in some insect species. *Colletotrichum* species are plant fungal pathogens that during infection of a host tissue, the fungus has to evade plant hydrolases that degrade fungal chitin by the conversion of chitin to chitosan through the production of CDA's (Blair *et al.*, 2006). This defense mechanism makes these fungi potential producers of CDA's (Blair *et al.*, 2006). A high degree of enzymatic deacetylation is difficult to achieve mainly due to the insoluble and crystalline nature of chitin, therefore modifications of chitin structures should be done to improve deacetylation (Beaney *et al.*, 2007).

### 3.3 Methodology



#### 3.3.1 Materials

The cephalothoraxes of the specie *Litopenaeus vannamei* were kindly supplied by Biopolimeros Acuicolas S.A. de C.V. These heads were obtained from shrimp farms of Guasave, Sinaloa (Mexico) and immediately frozen (-9°C) and transported to the laboratory. The wastes were minced in an industrial mincer (Torrey 32-3, Mexico) to a homogeneous particle size of 1mm and stored at -20 °C.

*Lb plantarum* was cultivated and maintained in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar at 30 °C. The inoculum was prepared in MRS broth by deposition from the bacterial slants and incubated at 30 °C for 24 h up to a cell count of 10<sup>8</sup> colony forming units per milliliter (CFU.ml<sup>-1</sup>). Commercial  $\alpha$ -chitin was purchased from Mahtani P.V.T. and used to comparison.

*Colletotrichum gloeosporioides* was provided by Dr. Patricia Larralde from CBG (IPN Reynosa Tamaulipas México).

Commercial astaxanthin standard (all-trans isomer, 98% purity, Sigma) was stored at -78 °C. Acetone (Technical grade) was supplied by Casa Miyako (Mexico) and used as received. Dimethylacetamide (98% purity, Sigma) and lithium Chloride (Sigma) were kept at room temperature.

Q-sepharose column and Bis-TrisHCl technical grade were purchase by Bio-rad. Ethilen glycol chitin was purchase from Sigma (USA) and reacylated by the method reported by Kauss and Bauch, (1988).

Commercial chitosans (kitomer) with initial DA of 14% and  $M_W$  of 450 g.mol<sup>-1</sup> was reacylated to a DA of 60% by the method reported by Sorlier *et al.* (2001).  $\alpha$ -Chitin was purified by biological method as reported by Pacheco *et al.* (2009) and by chemical method as reported by Percot *et al.*, (2002).  $\beta$ -chitin was purified by the chemical method described by Rocha-Pino *et al.*, (2008).

### 3.3.2 LAF procedure

The LAF procedure was similar to that reported by Cira *et al.* (2002). The shrimp waste was mixed with sucrose as carbon source (10 wt/wt%) and the starter (5 vol/wt%). Three kilograms and a half of this mixture was placed into a 5 kg-column reactor, described previously (Pacheco *et al.*, 2009). The reactor was incubated up to 144 h at 35 °C. Sample aliquots were withdrawn from the bottom and top modules, which corresponded to the liquid and solid fractions, respectively, every 24 h for further analyses. The product obtained after 144 h of fermentation was treated with minimum concentrations of HCl and NaOH according to Cira *et al.* (2002) to eliminate the remaining minerals and proteins and called hereafter BIO-chitin.

### 3.3.3 Chemical preparation of chitin

Chitin was chemically extracted by the methodology described by Percot *et al.*, (2003). One g of shrimp waste was submerged in an excess of HCl 0.25 M (40ml). After vigorous agitation of 20min samples were washed and lyophilized. 15ml of

NaOH 1M were added per 1g of the samples obtained and the solution was agitated during 24h at 70°C. After neutralization with water, the samples were washed and lyophilized for further characterizations.

### **3.3.4 Analyses of samples**

#### **3.3.4.1 Determination of pH, total titratable acidity (TTA) and LA production**

The pH and TTA were determined as reported by Pacheco *et al.*, (2009), for solid samples 1g of sample was diluted in water in a 1:10 (wt/vol) ratio for further determination. LA production was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Ten g of sample were diluted in water in a 1:10 (wt/vol) ratio and centrifugated. The supernatant obtained was filtered through a 0.45µm membrane, 20µL of the filtrate were injected into a chromatograph (Perkin Elmer 250) fitted with a diode arrangement detector. A column for organic acids Aminex (HPX-87H) was used with a mobile phase of sulfuric acid 0.008M and a flow rate of 0.06ml/min at 50°C.

#### **3.3.4.2 Growth of lactic acid bacteria (LAB) and coliforms in fermented products**

The bacterial growth in fermented shrimp wastes was determined by colony enumeration using MRS agar for LAB and Eosin Methylene Blue (EMB) agar for coliforms. Ten g of sample were homogenized in 90 mL of a saline solution at 0.09 wt/vol% and further decimal dilutions were prepared. The results were expressed as Colony forming units per mL (CFU.mL<sup>-1</sup>).

#### **3.3.4.3 Determination of moisture, ash, protein, lipid contents, D<sub>MIN</sub>% and D<sub>PROT</sub>%.**

The moisture and ash contents were determined in the raw shrimp wastes and solid fraction from the LAF by weight difference according to the A.O.A.C (1980) technique. Total nitrogen contents were measured by Kjeldahl method in automated equipment (Buchi, Switzerland). The nitrogen content in chitin was obtained from a



sample of purified chitin according to Black and Schwartz (1950). Corrected protein contents were calculated by the subtraction of the chitin nitrogen to the total nitrogen content and multiplied by 6.25.

Lipid content was measured by organic solvent extraction in a soxhlet extraction apparatus (SER 148 VELP SCIENTIFICA). Two g of homogenized matter previously hydrolyzed and dried at 103°C contained in a thimble, were immersed in a vessel with 30-60mL of boiling petroleum ether for fat matter extraction. After 60min of reflux, extraction vessels were dried during 30min for posterior weighing. The results were expressed as total fat in g per 100g of wet sample.

D<sub>PROT</sub>% and D<sub>MIN</sub>% (Y) for the fermented samples were obtained using the equation 3.1.

$$Y(\%) = \frac{[(X_0 \times S_0) - (X_R \times S_R)]}{X_0 \times S_0} \times 100 \quad (3.1)$$

where:  $X_0$  and  $X_R$  are the protein or ash content percentages in raw and fermented samples, respectively.  $S_0$  and  $S_R$  are raw and fermented sample weights (g), respectively.

### 3.3.4.4 Proteolytic activity

The proteolytic activity was evaluated by a modification of the Anson method (Ramirez-Coutiño, 2009). Hemoglobin and casein were used as substrates for activity determination at pH 5 in universal buffer (0.05 M) and pH 6 and 7 in phosphate buffer, respectively. 1 g of fermented solid was homogenized in 10mL of distilled water and centrifuged at 4°C for 30min at 11,500 rpm. 150 µL of the supernatant were added to 1 ml of substrate (1 wt/vol%) in buffer and incubated for 1 h at 35 °C. Reaction was quenched by the addition of 5 vol/vol% of trichloroacetic acid and then centrifuged. The absorbance of supernatant was measured at 280 nm. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that produces an increment of 0.001 of absorbance unit per minute under the assay condition. Proteolytic activity was expressed as activity units per total protein (specific activity) per gram of silage.

### 3.3.4.5 Determination of free-astaxanthin by high performance liquid chromatography (HPLC)

The determination of the free-astaxanthin content was carried out after acetone extractions in the solids and liquid lyophilized fractions from LAF, following the previously reported method (Gimeno *et al.*, 2007). Chromatographer (HP1100 series, Hewlett-Packard, USA) equipped with a photodiode array detector (DAD) and column X-terra RP-C18 (Waters, Inc. USA) with methanol:acetonitrile:ethyl acetate:water (70:10:10:10) mobile phase in a 0.7 mL.min<sup>-1</sup> flow was used.

### 3.3.5 Modeling the acidification process and growth of LAB

Bacterial growth and acidification rates were estimated by the Gompertz model using the non-linear regression software (STATISTICA StatSoft, Inc), according to the equation 3.2.

$$y(t) = P_{\max} \exp(-b \exp(-kt)) \quad (3.2)$$

Where:  $y(t)$  is the LA produced (TTA in mmol/g) or log of CFU/ml at time (t);  $P_{\max}$  is the maximum product concentration (mmol/g) or log of CFU/ml at  $t \rightarrow \infty$ ;  $b$  is a constant related to the initial conditions when  $t=0$ , then  $y(t) = y_0 = a \exp(-b)$ ;  $k$  is the acidification rate constant or bacterial growth rate (h<sup>-1</sup>). When  $y$  is the LA concentration, the maximum rate of acid production ( $V_{\max}$ ) was calculated from parameters of the model as  $V_{\max} = 0.368 P_{\max} k$  (see anexo A.1b).

### 3.3.6 Chemical deacetylation of chitin and products purification

Heterogeneous deacetylation was carried out according to the Freeze-Pump-Thaw (FPT) method as described by Lamarque *et al.* (2005). Chitins previously obtained by biological and chemical methods were deacetylated FPT cycles (Lamarque *et al.*, 2004).

### 3.3.7 Physicochemical characterization

#### 3.3.7.1 Determination of $M_w$ and DA.

For  $M_w$  determination, chitins were solubilized in *N,N*-dimethylacetamide containing 5 wt/vol% lithium chloride. Average  $M_w$  of chitins was determined using an automatic capillary viscometer (Viscologic TI 1 SEMATech). The parameters of Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada used were  $\alpha=0.69$  and  $K=2.4 \times 10^{-4} \text{ Lg}^{-1}$  (Pacheco *et al.*, 2007).

The determination of DA was carried out by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ NMR), with a modification of the method described by Lamarque *et al.* (2005). Ten mg of sample were dissolved in a solution of  $\text{DCl/D}_2\text{O}$  20 wt/wt% by magnetic stirring during 5h. Different solubilization temperatures were analyzed to obtain the highest reproducibility, 40-50°C, 60-70°C, 80°C. The spectra were recorded on spectrometer (Bruker AC 200) at 200MHz for  $^1\text{H}$  at 25 °C. Trimethyl silyl 3-(trimethylsilyl) propionic acid was used as external reference for signal identification. The DA was calculated according to the procedure described by Hirai *et al.* (1991) for chitosan.

#### 3.3.8 Production of enzymatic extract of *Colletotrichum gloeosporioides*

The enzymatic extract from *Colletotrichum gloeosporioides* was grown in 3- l instrumented bioreactor (Applikon B.V. Holland) for 3 days at 25°C and at pH 6. Two liters of medium consisting of 15g of glucose, 6.6g of glutamic acid, 1 g of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.8mg of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1mg of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3mg of  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.4mg of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1mg of thiamine and 1mg of nicotinic acid per 1 Liter of demonized water. The medium was inoculated with  $1 \times 10^7$  spores per liter (Tsigos and Bouriotis, 1995).

#### 3.3.9 Purification of enzymatic extract

The enzyme was partially purified from the culture filtrate of the fungus. Precipitation with ammonium sulfate (40 and 80 % w/v) was conducted, followed by dialysis. The product was loaded onto a Q sepharose fast flow column (300mm x 15mm) previously equilibrated in buffer Bis-TrisHCl pH 5.8. The column was washed with the buffer and the retained proteins were subsequently eluted with a linear gradient of NaCl. Deacetylase activity was determined by espectrophotometric method as

reported by Kauss and Bauch, (1988). One unite of activity was defined as de quantity of enzyme necessary to liberate 1  $\mu\text{mol}$  of acetate from etilen glycol-chitin. Acetate production as indirect measure of deacetylation was determined by FIT gas chromatography as reported by Win *et al.*, (2001) in a FIT gas chromatographer (Hewlett Packard 5890 series II) equipped with an AT-1000 Altech capillary column (0.53mm x 10m).

### 3.3.10 Evaluation of partial CDAs in different chitins as substrates

Partial purified CDAs were evaluated in reacetlyated chitosan (DA 60%) to obtain enzyme and substrate concentrations at pH 8.5 and temperature of 45°C (Kauss and Bauch, 1988). Chitins from different sources were modified physically and chemically to improved enzymatic deacetylation. Partial chemical deacetylated chitins were obtained by the FPT method reported by Lamarque *et al.*, 2005. Microwave deacetylated chitins were obtained by the method reported by Sahu *et al.*, (2008) Chitin sponge and precipitated chitins were produced by the method described by Flores *et al.*, 2007.

Acetate production rates were estimated by the Gompertz model using the non-linear regression program (STATISTICA (StatSoft, Inc), according to the equation 3.2, where:  $y(t)$  is the acetate produced at time (t);  $a$  is the maximum product concentration ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) at  $t \rightarrow \infty$ ;  $b$  is a constant related to the initial conditions when  $t=0$ , then  $y(t) = y_0 = a \exp(-b)$ ;  $k$  is the acetate production rate constant ( $\text{h}^{-1}$ ). Enzymatic parameters as  $K_M$  and  $V_{MAX}$  were determined by the model of Lineweaver-Burke using the acetate production rates determined by the Gompertz model.

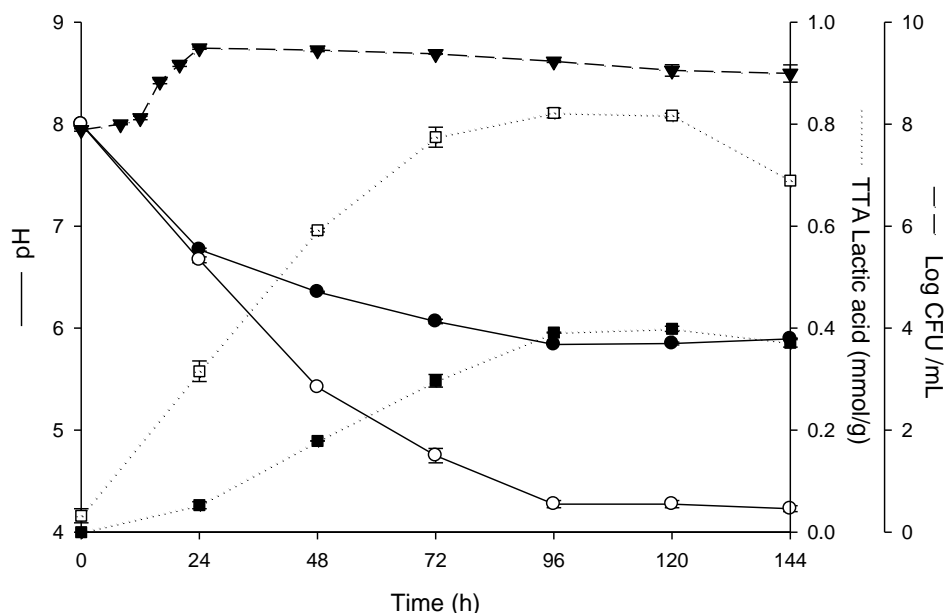
## 3.4 Results and discussion

### 3.4.1 Mineral and protein elimination during LAF

#### 3.4.1.1 Acidification, LA production, bacterial growth and $D_{MIN}$ pattern

The pH changes in the acidification process were analyzed in both the solid and liquid fractions of the reactor during the 144 h of the LAF. The initial 24 h displayed decrease in pH in both fractions, from pH 8 to 6.8. The minimum pH in the solids (5.8) and in the liquor (4.2) were recorded at 96 h, these values remained constant until the end of the experiment (Figure 3.1). LA production showed a gradual

increase reaching the steady state between 72 and 96 h in both sections of the reactor (Figure 3.1).



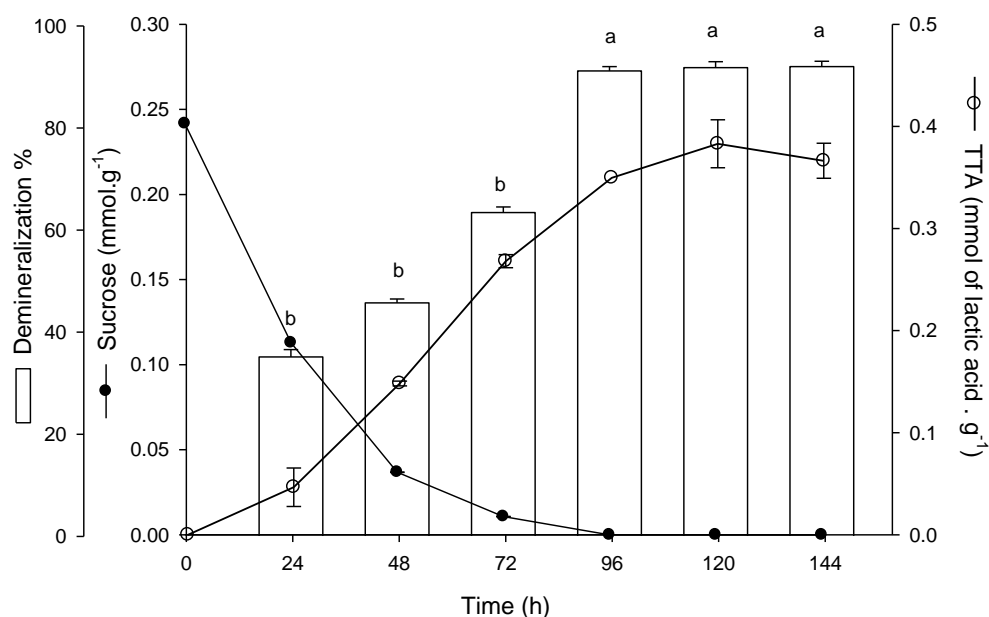
**Figure 3. 1** pH in liquor (○) and solids (●), lactic acid in liquor (□) and solids (■), and lactic acid bacteria growth (▲) in samples obtained during lactic acid fermentation of shrimp waste *Litopenaues vanameii* during 144h.

The values of LA produced during LAF were adjusted to the Gompertz model ( $R^2 > 0.97$ ) where the estimated parameters in the solid fraction indicated a  $k$  value of  $0.036 \text{ h}^{-1}$  with a  $V_{max}$  of  $0.006 \text{ mmol.g}^{-1}$  and the maximum product concentration ( $P_{max}$ ) of  $0.42 \text{ mmol.g}^{-1}$ . The liquid fraction showed  $k = 0.056 \text{ h}^{-1}$ ,  $V_{max} = 0.016 \text{ mmol.g}^{-1}$  and  $P_{max} = 0.78 \text{ mmol.g}^{-1}$ . The values obtained in the liquid fraction were higher than those from previous works reported elsewhere using a mixture of shrimp waste species (Cira *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2009). Besides, the colony enumeration of LAB showed an increase from  $1 \times 10^8 \text{ CFU.mL}^{-1}$  at the initial time to  $3.2 \times 10^9$  after 24 h of LAF before reaching its stationary phase (Figure 3.1). The growth rate and the maximal growth of LAB obtained by the Gompertz model were  $0.125 \text{ h}^{-1}$  and  $3 \times 10^9 \text{ CFU.mL}^{-1}$ , respectively and these values were also higher than those previously reported (Cira *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2009).

The initial count of coliforms was  $1 \times 10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> and increased during the first 24 h to  $6 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. However after 48 h the value diminished drastically to less than  $1 \times 10^6$  CFU at 72 h, which was assumed due to the presence of LAB (data not shown). The absence of acetic acid according to the HPLC analysis indicated adequate growth of homofermentative bacteria thus preventing spoilage. It is worth mentioning that the short handling time of the shrimp waste (cephalothoraxes) from the farms decreased the post-harvest contamination, thus favoring the development of LAB and the consequent production of LA.

D<sub>MIN</sub> of shrimp waste was measured every 24 h of the LAF (144 h) to assess the shortest time required to attained maximum D<sub>MIN</sub>. 30% of D<sub>MIN</sub> were observed after 24 h followed by an increase to 92 % in 96 h, when the maximum LA production (0.4 mmol.g<sup>-1</sup>) in the solids was attained. No significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed after this time, which can be explained by the absence of carbon source after 72 h that compromised the LA production (Figure 3.2).

D<sub>MIN</sub> was determined as a response variable influenced by the temperature and TTA following an earlier reported procedure to give an experimental value of 92% (Pacheco *et al.*, 2009). Shrimp waste D<sub>MIN</sub> by LAB have been reported by different authors. Cira and co-workers claimed a D<sub>MIN</sub> of 87% after 144 h of fermentation (Cira *et al.*, 2002), a 89 D<sub>MIN</sub>% under agitation was later reported (Rao *et al.*, 2005) and more recently 72 D<sub>MIN</sub>% in an optimized process (Bhaskar *et al.*, 2007). The high value obtained in the present work can be explained by the increase in LA production, the shrimp specie used and the smaller particle size, which allowed better acid diffusion and efficient separation of the liquid fraction (Pacheco *et al.*, 2009). However, our value is not the highest reported since other authors mentioned D<sub>MIN</sub> above 94% (Cremades *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2008). Nevertheless they employed a more complex system based on pretreatment or two-stage fermentation. Our maximal D<sub>MIN</sub> attained at 96 h suggests an optimal in fermentation time close to 96h as a process improvement.

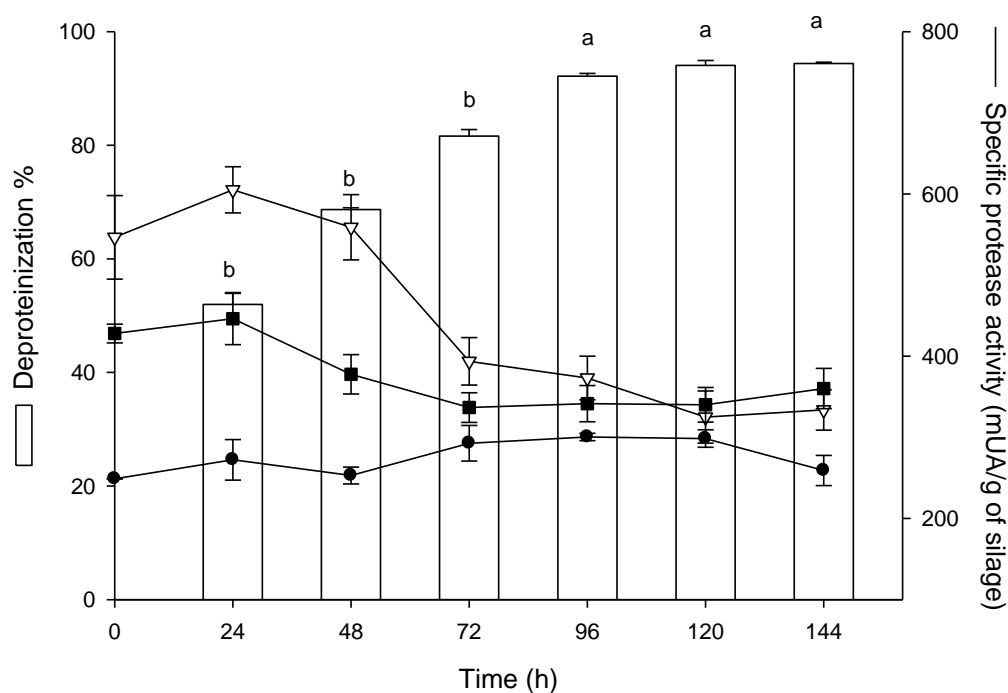


**Figure 3. 2** TTA expressed as mmol of lactic acid per g of silage (○), Sucrose consumption expressed in mmol per g of silage (●) and demineralization pattern (□) during lactic acid fermentation at 35°C.

#### 3.4.1.2 Determination of $D_{\text{PROT}}$ and protease activity.

The  $D_{\text{PROT}}$  percentages were monitored every 24 h to attain the largest amount of protein removed at the first 48 h ( $D_{\text{PROT}} = 70\%$ ), and a maximal  $D_{\text{PROT}}$  of 94% after 96 h (Figure 3.3). It has been suggested that  $D_{\text{PROT}}$  of shrimp wastes during LAF is carried out by endogenous enzymes as well as those produced by the LAB (Shirai *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2009). Since environmental conditions as temperature and pH are required for enzymatic activity, the protease activities at different pH were evaluated. The experiments conducted at pH 7 showed a maximal protease activity (600 mUA) at 24 h, whereas samples collected after 72 h displayed values below 400 mUA. Similar behavior was observed at pH 6, with the highest activity of 430 mUA at 24 h. Protease activity at pH 5 however, showed the lowest activity (around 250 mUA) without significant LAF time variations (Figure 3.3). Several digestive enzymes such as trypsin, cathepsin, collagenase chymotrypsin and elastase from shrimp hepatopancreas had been reported with proteolytic activity in a

wide pH range (5-8) (Oh *et al.*, 2000; Gordon, 2005). Therefore, variation in  $D_{\text{PROT}}$  might be related to pH. Besides,  $D_{\text{PROT}}$  process persisted until a maximum of 94% after 48 h, which points out the presence of protease activities also at pH 5-6. It is important to note that the value of  $D_{\text{PROT}}$  obtained in this study was higher than those previously reported in the literature (Rao *et al.*, 2000; Cira *et al.*, 2002; Sini *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2009) without the need of pre-treatment or two stage fermentation. This might be attributed to (i) the presence of proteolytic enzymes with activities in a relatively wide pH range, (ii) the smaller waste particle size promoting the action of proteases and (iii) the collateral  $D_{\text{MIN}}$  process that favors the availability of proteins.



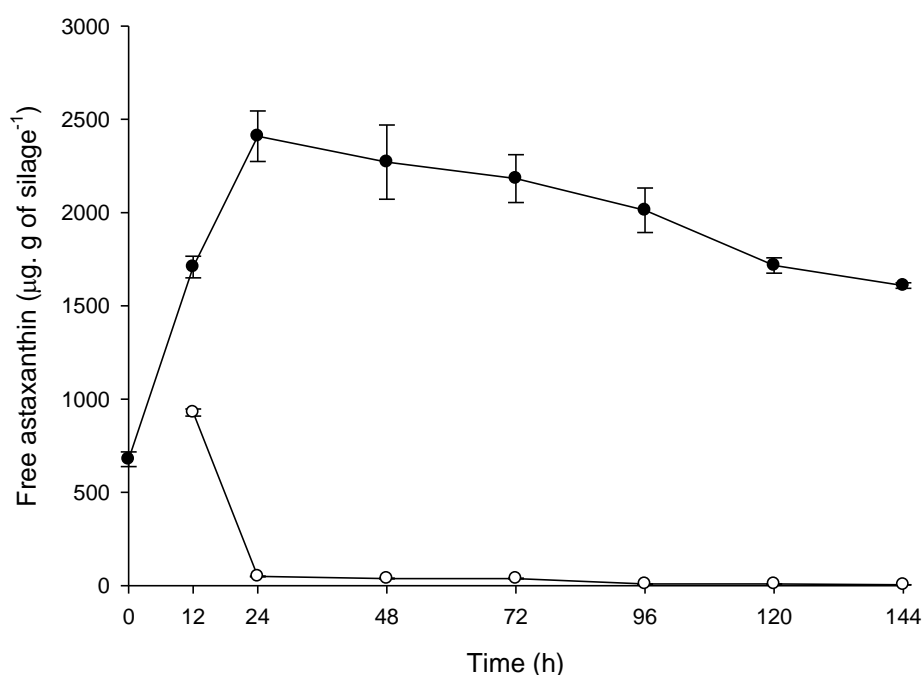
**Figure 3. 3** Protease activity in solid fractions from shrimp waste *Litopenaues vanameii* at pH 7 (Δ), pH 6 (■), pH 5 (●) and deproteinization pattern (□) during the 144h of fermentation a 35°C

### 3.4.1.3 Astaxanthin extraction.

The highest pigment recovery (2,400  $\mu\text{g}$  of free astaxanthin per g of silage) was attained in the solid fraction at 24 h (figure 3.4). Although the concentration of free



astaxanthin extracted decreased after 48 h, the values obtained outweigh widely those observed in previous reports;  $43 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Sachindra *et al.*, 2007),  $115 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Gimeno *et al.*, 2007) and  $225 \mu\text{g.g}^{-1}$  at (Pacheco *et al.*, 2009). This high pigment content is attributed to the large amount of astaxanthin present in the *Litopenaeus vanameii* specie as well as the efficient waste handling carried out in this work. The contents of free astaxanthin extracted between 48 and 96 h were not significantly different ( $p < 0.05$ ) but at 120 h the carotenoid decreased significantly by 35%, which suggests from the standpoint of pigments recovery, the decrease in fermentation time below 24h to prevent astaxanthin oxidation. In the liquid phase pigment recovery was  $928 \mu\text{g}$  per g of liquor at 12 h, then the values decreased below  $50 \mu\text{g.g}^{-1}$  due to product oxidation (figure 3.4).



**Figure 3. 4**  $\mu\text{g}$  of astaxanthin in solids (●) and liquor (○) during the 144h of fermentation at  $35^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.2 Physico-chemical characterization

#### 3.4.2.1 Determination of protein and ash content, $M_w$ and DA.

The product obtained after 144 h of fermentation (and mild treatment with HCL and NaOH) was called BIO-chitin. The sample obtained by full chemical extraction (Percot *et al.*, 2003) was called chemical chitin. Raw material, samples collected during the fermentation process as well as the chitins treated by chemical methods and a commercial chitin, were characterized in terms of protein, ash content, intrinsic viscosity ( $[\eta]$ ),  $M_w$  and DA, which results are shown in Table 3.1. The fat content was determined in samples before and after 144h of fermentation, being  $27\pm1.5\%$  and  $23\pm2\%$ , respectively. Lipids were previously removed by acetone extraction in order to avoid interferences in mineral and protein content determinations. The results indicated a reduction of protein and ash content percentage from raw material until 96 h. After 96 h of LAF, the protein content did not differ significantly ( $p < 0.05$ ) within fermented samples, BIO chitin, chemical chitin and commercial chitin. The ash contents in samples obtained at 96, 120 and 144 h were significantly different to BIO, chemical and commercial chitins (Table 1). The  $[\eta]$ , which indirectly provides the  $M_w$  of the biopolymer, showed the highest values for samples obtained during fermentation, which were above  $4,100 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $1,400 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), although slight  $[\eta]$  reduction was observed in the final BIO chitin  $[\eta] > 3,700 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $1,200 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) after the final mild chemical treatment. Chitin obtained by chemical method and commercial chitin showed  $[\eta] < 3,000 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  corresponding to  $M_w < 900 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Viscosity values after chemical treatment were below  $3,300 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  (Percot *et al.*, 2003), which is attributed to partial hydrolysis of the biopolymer owing to contact with relatively severe acid and/or alkali conditions. However, the DA were similar among all samples (94%) and similar to the values reported for  $\alpha$ -chitins (91-93%) obtained from shrimp wastes (Percot *et al.*, 2003; Stawsky *et al.*, 2008). These results indicate that our LAF process for chitin extraction minimizes the degradation of the biopolymer by reducing the hydrolysis. The preservation of viscosity values and therefore the relatively high molecular weight of the material, as well as the maintenance of DA provide better characteristics of the chitin as starting material for further applications (Synowiecki *et al.*, 2003). In addition, the process mass yield was 45%, which is 8 percentage points higher than that attained by the chemical method (37%).

**Table 3.1** Protein and ash content in dry basis, intrinsic viscosity, Molecular weight ( $M_w$ ) and acetyltyon degree (DA) from samples obtained during fermentation of shrimp waste *Litopenaeus vanameii* and BIO, chemical and commercial chitins.

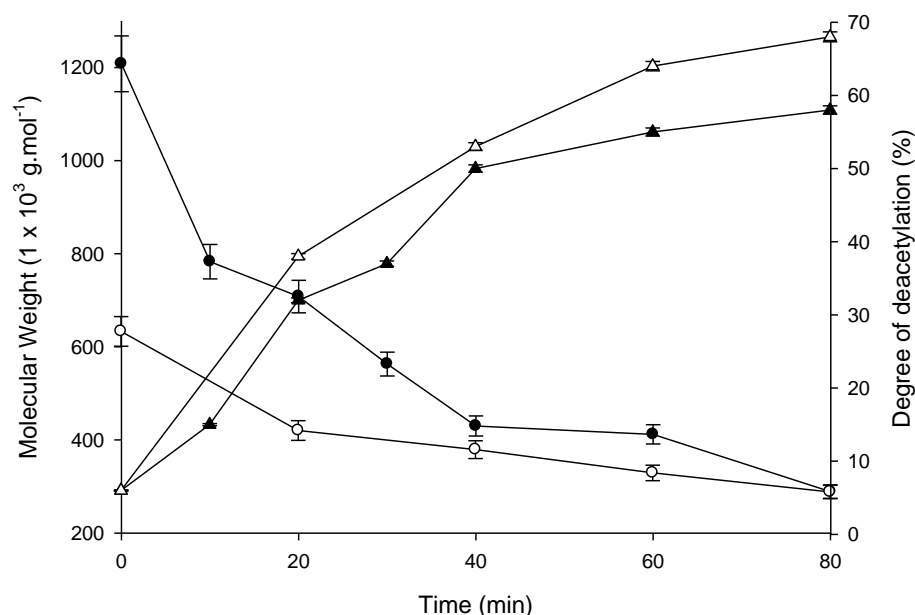
Samples	Protein content (%) <sup>*</sup>	Ashes (%) <sup>*</sup>	$[\eta]$ (mL.g <sup>-1</sup> )	$M_w$ (1 x 10 <sup>3</sup> g.mol <sup>-1</sup> )	DA
Raw	21.93 ± 0.9 <sup>c</sup>	20.19 ± 0.1 <sup>d</sup>	ND	ND	ND
T24	13.54 ± 1.01 <sup>b</sup>	19.48 ± 0.22 <sup>d</sup>	4345 ± 150 <sup>b</sup>	1481 ± 11	96 ± 1
T48	9.67 ± .78 <sup>b</sup>	18.06 ± 0.16 <sup>c</sup>	4192 ± 160 <sup>b</sup>	1406 ± 12	95 ± 2
T72	6.39 ± .045 <sup>b</sup>	14.70 ± 0.21 <sup>c</sup>	4203 ± 110 <sup>b</sup>	1411 ± 7.4	96 ± 1
T96	2.92 ± .51 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.10 <sup>b</sup>	4152 ± 88 <sup>b</sup>	1387 ± 5.2	95 ± 1
T120	2.24 ± .28 <sup>a</sup>	6.03 ± 0.18 <sup>b</sup>	4280 ± 112 <sup>b</sup>	1449 ± 7.3	95 ± 2
T144	2.12 ± 0 <sup>a</sup>	6.23 ± 0.21 <sup>b</sup>	4192 ± 122 <sup>b</sup>	1406 ± 8.3	95 ± 1
BIO-Chitin	0.56 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.13 <sup>a</sup>	3758 ± 135 <sup>b</sup>	1200 ± 9.6	94 ± 1
Chemical Chitin	0.26 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.15 <sup>a</sup>	2965 ± 192 <sup>a</sup>	851 ± 16	94 ± 1
Commercial Chitin	< 2 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.2 <sup>a</sup>	2438 ± 25 <sup>a</sup>	641 ± 0.8	92 ± 1

\*Mean of duplicates. Values in a column with the same letter were not significantly different at  $p < 0.05$  determined by multiple comparisons by means of tukey kramer's test. ND = Not determined.

### 3.4.3 Chemical deacetylation of chitins

#### 3.4.3.1 Effect in the $M_w$ and DD of resulted products with a first FPT deacetylation,

The results showed that during the first 40min of reaction both samples (BIO-C and CHC) showed deacetylation degrees about 55%, CHC was slightly higher (5%) than BC. During the subsequent 40min, the difference in the DD between the two samples increased 10%, reaching the steady state at 60min with DD of 70% and 60 % for CHC and BC, respectively (Figure 3.5). The final DD reached after one deacetylation stage may be due to the initial structure of the molecules. Hydrogen bonds, which give chitin rigidity and crystallinity, may affect chemical reactions of functional groups (Chebotok *et al.*, 2007). Heterogeneous deacetylation takes place faster in the amorphous region than in the crystalline one (Nemtsev *et al* 2002; Lamarque *et al.*, 2004; Chebotok *et al.*, 2007).



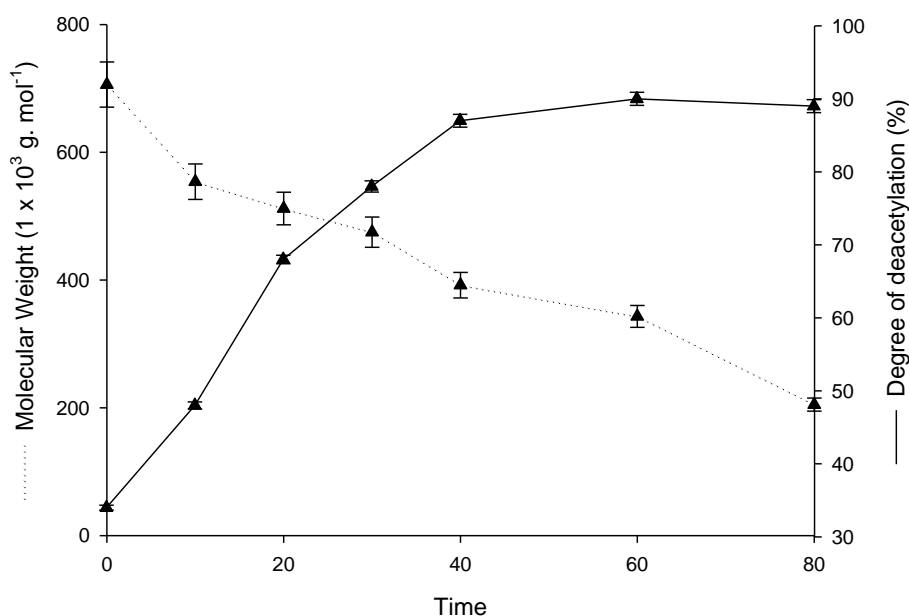
**Figure 3. 5** Deacetylation degree and molecular weight determined during FPT deacetylation on chemical chitin (○) and biological chitin (●)

The results during the first stage of deacetylation indicated a loss of 40% in the  $M_W$  for both chitins after 20 min of reaction (Figure 3.6). However BC showed  $M_W$   $300 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  higher than CHC. Studies in deacetylation process suggest that  $M_W$  decreases faster during the first 60min of reaction, and then continues to gradually decline (Hwang *et al.*, 2002). After increasing the reaction time,  $M_W$  of CHC decreased slower than BC. It is important to mention that chitin with DD around 50% was difficult to solubilize and reacetylate, hence the determination of its  $M_W$ . After 80min, the  $M_W$  in both samples was quite similar, indicating that the loss of  $M_W$  for BC was higher than for CHC after 30 min of reaction. Nevertheless until 60min, BC produced samples with higher  $M_W$  than CHC. Although a small amount of NaOH molecules during deacetylation are involved in the reaction with glycosidic bonds and therefore the hydrolysis of the chain, this type of degradation reactions are random and just one degradation reaction in the middle of chitosan or chitosan chain will reduce dramatically the  $M_W$  (Tsaih *et al.*, 2002). The increase in reaction time can also reduce the  $M_W$ , when acetyl groups start to decrease the reaction slows down, leaving more NaOH molecules available to produce glycosidic bonds oxidation (Prashanth *et al.*, 2002). Lamarque *et al.* (2005) reported low losses in  $M_W$  using the FPT process due to the oxygen absence. However the largest preservation of  $M_W$

was observed in  $\beta$  chitin, which is more reactive and favors de reaction rate (Lamarque *et al.*, 2004). In our study an increment on FPT cycles before first deacetylation would be necessary to completely eliminate oxygen and as a consequence decrease  $M_W$  losses.

### 3.4.1 Effect in the $M_W$ and DD of resulted products with second FPT deacetylation,

Second heterogeneous FPT deacetylation was carried out in samples obtained from BC after 20 min of reaction with initial DA of 65%,  $M_W$  around  $720 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $I_{CR}$  of 74.8%. During the first 40min of deacetylation, the degree of deacetylation increased by about 10% every 10min up to a maximum of 90%. Experiments conducted at 60 and 80min did not increase DD.  $M_W$  diminished gradually from  $720 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  to  $400 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  at 40 min, later the  $M_W$  was  $250 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  after 80 min (Figure 3.6). A lower loss on the  $M_W$  can be explained by the mayor availability of acetyl groups that favors deacetylation, reducing the risk of depolymerization. The use of BC in FPT deacetylation produced chitosans with medium  $M_W$  and 90% of DD. For a same  $M_W$ , CHC showed DD of 40% after 20 min of a first deacetylation.



**Figure 3. 6** Molecular weight (- -▲- -) and degree of deacetylation (-▲-) of the second deacetylation FPT process of biological chitin.

### 3.4.2 Partial purification of chitin deacetylases enzymes (CDAs) from *Colletotrichum gloeosporioides*.

Precipitation with ammonium sulfate of the filtrated liquid culture from *Colletotrichum gloeosporioides* produced an enzyme activity yield of 50% with a purification fold of 4.8. After Q sepharose fast flow column a purification fold of 35.4 was reached (Table 3.2). Previous reports have shown that precipitation with sulfate followed by dialysis recovered 60% of enzyme activity from *Colletotrichum lindemuthianum* (Kauss and Bauch, 1988). A yield of 80% with purification fold of 8.5 was obtained by Tsigos *et al.* (1995) after filtration and Q sepharose stage. The fold of 35.4 obtained in this work showed that the purification process was efficient after this two purification steps. A high Specific activity was found.

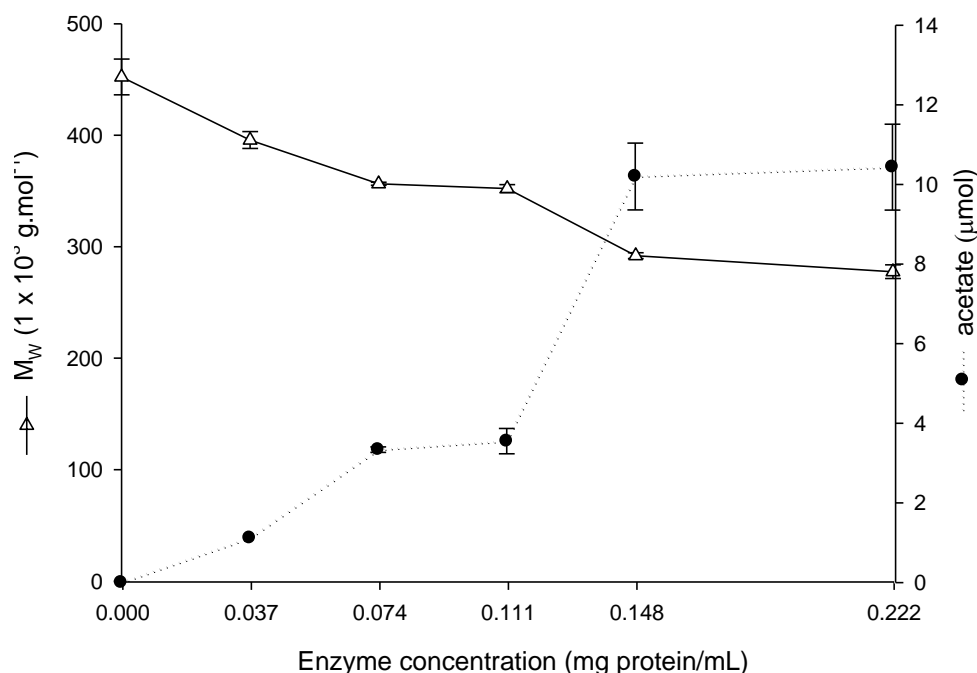
**Table 3.2** Partial purification of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides*.

Step	Protein (mg.mL <sup>-1</sup> )	Total volume (mL)	AU /mL	Total Activity	Specific Activity	Yield (%)	Purification (Fold)
Crude extract	0.107	200	0.014	2.8	0.13	100	1
Precipitate	0.185	12	0.113	1.36	0.618	48.6	4.8
Q-Sephadex	0.022	4.2	0.024	0.1008	4.6	3.6	35.4

### 3.4.3 Determination of enzyme and substrate concentration for enzymatic deacetylation with partial purified chitin deacetylases of *Colletotrichum gloeosporioides*.

Although a partial purification of the enzyme was performed, different enzyme and substrate concentrations were tested to obtain the best conditions to evaluate in the different chitin substrates. The application of partially purified CDA's in reacylated chitosan showed the higher acetate production (indirect measure of deacetylation) with an enzyme concentration of 0.148 mg·mL<sup>-1</sup> (Figure 3.7). The  $M_w$  decreased from

$450 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  to  $300 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . This may be due to the presence of chitinases in the extract which have the possibility to hydrolyze the biopolymer (Ramirez-Coutiño *et al.*, 2006).



**Figure 3. 7** Molecular weight and acetate production during deacetylation of reacetylated chitosan (DA 60% ) at different enzyme concentrations at 45°C.

The results of the evaluation of the different substrate concentrations determined by the Gompertz model ( $R^2 > 0.97$ ), showed higher acetate production ( $P_{max}$ ) of 12.59  $\mu\text{mol}$  and 12.9  $\mu\text{mol}$  of acetate using 5mg of chitin per  $\text{mL}^{-1}$  and 7.5mg· $\text{mL}^{-1}$ , respectively (Table 3.6). Higher acetate production rates were 0.026  $\text{min}^{-1}$  and 0.025  $\text{min}^{-1}$ , corresponding to the substrate concentrations of 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 12.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectively (Table 3.3). A higher substrate concentration could increase the rate of acetate production due to the higher concentration of *N*-acetyl groups available for the enzyme in the media. The minimum reaction time to obtain the highest acetate production was 180 min for all substrate concentrations tested (Figure 3.8). The enzymatic parameters of  $K_M$  and  $V_{MAX}$  obtained with the Lineweaver-Burke model

showed a  $km$  of 4.06 mg·mL and  $V_{MAX}$  of 0.035  $\mu\text{g}\cdot\text{mLmin}^{-1}$  with the partial purified enzymes obtained and at the conditions evaluated herein this work.

**Table 3.3** Kinetic parameters of acetate production using different substrate concentrations of reacylated chitosan with DA of 60%.

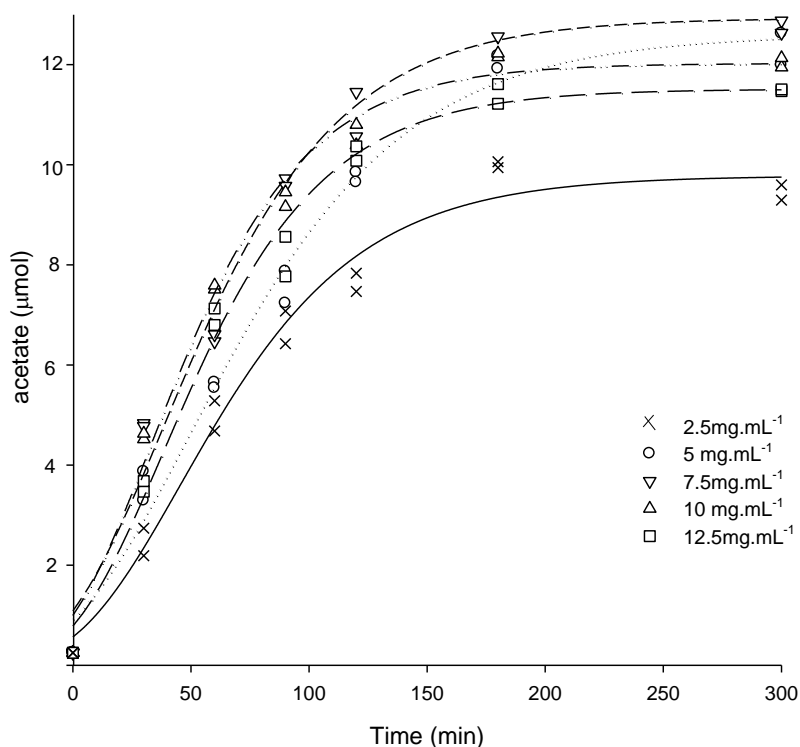
Chitin* (mg.mL <sup>-1</sup> )	$P_{max}$	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$
2.5	8.81 ± 1.22	0.02 ± 0.003	0.98
5.0	12.59 ± 0.39	0.019 ± 0.002	0.99
7.5	12.9 ± 0.37	0.024 ± 0.002	0.98
10.0	12.0 ± 0.27	0.026 ± 0.002	0.99
12.5	11.49 ± 0.27	0.025 ± 0.002	0.99

Parameters obtained by de Gompertz model.

#### **3.4.4 Application of partial purified CDA's from *Colletotrichum gloeosporioides* in different chitin substrates.**

The application of the partially purified CDAs in the different chitins and modified chitins, showed not differences in the degree of acetylation in chitins extracted by biological and chemical methods (Tabla 3.4). These results are in agreement with the reported by Beaney *et al.*, (2006) and Win *et al.* (2001), which could be due to the higher crystalline index that difficult enzyme penetration (Beaney *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2001).  $\beta$ -chitin showed a difference of 5% in the final DA from the initial DA. The parallel form of the crystalline structure of the  $\beta$ -chitin makes it more suitable for deacetylation (Lamarque *et al.*, 2004). Diminution around 7% of the DA was observed in sponge and precipitated sponge chitin. Despite a lower  $M_w$  (200 – 300 x 10<sup>3</sup> g·mol<sup>-1</sup>) is observed in sponge chitin, higher crystalline structure could inhibit enzymatic deacetylation process (Beaney *et al.*, 2006). Partial purified CDA's were able to produce up to 25% of deacetylation with 18% of  $M_w$  losses in hydrolyzed chitin (Table 3.4).





**Figure 3. 8** Acetate production with different substrate concentration of reacetylated chitosan (DA = 60%) at different reaction times.

**Table 3.4** Molecular weight and degree of acetylation of chitin samples before and after partial purified enzyme evaluation

Sample	Initial $M_w$ ( $1 \times 10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	Final $M_w$ ( $1 \times 10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	Initial DA	Final DA
BIO-CH <sup>a</sup>	1200 ± 72.5	1198 ± 92.6	95.5 ± 1	95.3 ± 1
BIO-CH powder	963 ± 93.2	909 ± 38.8	93 ± 1.8	90.6 ± 1.7
CHC <sup>b</sup>	851 ± 95.8	839 ± 82.3	94.5 ± 1.4	94.41 ± 2.5
β-Chitin	831 ± 2.3	799 ± 12.0	89.2 ± 1.01	83.7 ± 1.3
DBIO-C powder <sup>c</sup>	783 ± 23.6	713 ± 23.6	72.8 ± 1.1	60.8 ± 1.38
MiWe BIO-C <sup>d</sup>	413 ± 12.2	371 ± 5.8	91 ± 1.5	88.38 ± 1.2
CHS <sup>e</sup>	334 ± 26.2	329 ± 8.3	92.4 ± 0.7	86.29 ± 1.7
CHS-P <sup>f</sup>	267 ± 6.5	275 ± 2.3	89.4 ± 1.5	81.55 ± 1.6
HCH <sup>g</sup>	102 ± 8.9	86 ± 7.4	79.9 ± 2.9	55.3 ± 2.7

<sup>a</sup>Biological chitin, <sup>b</sup>Chemical chitin, <sup>c</sup>Biological powder chitin chemically deacetylated, <sup>d</sup>Microwaved chitin, <sup>e</sup>Chitin sponge, <sup>f</sup>Precipitated chitin from sponge, <sup>g</sup>Hydrolyzed chitin.

### 3.5 Conclusions

LAF of shrimp waste (*Litopenaeus vanameii*) proved to be an effective biological method for chitin and astaxanthin recovery. High LA production and lower particle size increased mineral solubilization (92%). Proteolytic enzymes with a wide pH range activity, efficient separation of fractions, and the increase of proteins availability cause by minerals removal, enhanced  $D_{\text{PROT}}$  (94%) and carotenoide extraction ( $2400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Diminution in fermentation time (96h) could be an improvement of the biological process that also prevents astaxanthin oxidation. The preservation of  $M_W$ , DA and  $I_{\text{CR}}$  of BIO-chitin, makes this biopolymer a promising starting material for further applications.

The use of heterogeneous deacetylation FPT has shown to be an efficient method to produce high deacetylated chitins and chitosan, with high molecular weights from chitins purified by a biological method.

The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* was able to produced chitin deacetylases enzymes. Precipitation with ammonium sulfate and Q-sepharose purification were effectives to enrich 35 times the CDA's with a yield of 50%. Chitin with DA 60% obtained by reacetylation of commercial chitosan, was used for the determination of deacetylation conditions and enzymatic deacetylation parameters. CDAs of *Colletotrichum gloeosporioides* proved to be able of deacetylated hydrolyze chitins with low  $M_W$ .

---

# CAPÍTULO CUATRO:

## EVALUATION OF CHITOSANS AND *Pichia guilliermondii* AS GROWTH INHIBITORS OF *Penicillium digitatum*

Capítulo publicado en: *International Journal of Biological Macromolecules* (2008)43:20-26

Neith Pacheco, C. Patricial Larralde-Corona, Jose Sepúlveda, Stéphane Trombotto,  
Alain Domard y Keiko Shirai

---

### **Abstract**

Chitosans were obtained by room-temperature-homogeneous-deacetylation (RTHD) and freeze-pump-out-thaw-heterogeneous-deacetylation (FPT) from chitins purified from fermentations. Commercial chitosan was deacetylated by three-FPT-cycles. Chitosans and *Pichia guilliermondii* were evaluated on the growth of *Penicillium digitatum*. Medium molecular weight ( $M_w$ ) chitosans displayed higher inhibitory activity against the yeast than low  $M_w$  biopolymers. Chitosans with low degree of acetylation (DA) were inhibitory for yeast and mould. Therefore, a low  $M_w$  and high DA chitosan was selected for use against moulds combined with yeasts. Biopolymer and yeasts presented an additive effect, since chitosans were effective to delay spore germination, whereas yeast decreased apical fungal growth.

## 4.1 Introducción

Fungal diseases are the most common causes of commercial losses in food commodities, such as those caused by *Penicillium digitatum*, named green mould, which decays citrus fruits in postharvest. These fungal contaminations are often controlled by the application of chemical fungicides, such as imazalil, sodium ortho-phenylate or thiabendazole (Arras *et al.*, 2002). However, there are several problems associated with the use of such chemicals as the development of resistance from the pathogens, risk for human health as well as environmental impact (Droby *et al.*, 2002). Recently, yeasts have been used as antagonists of post-harvest pathogens on a variety of vegetables and fruits. The mechanisms used by yeasts against microbial phytopathogens are given usually by their ability to rapid colonization and competition against pathogens for nutrients and space (Arras *et al.*, 2002; Droby *et al.*, 2002). The application of natural compounds such as chitosan has been carried out as an effort to reduce or eliminate the use of chemicals since this biopolymer has been studied as an antimicrobial compound against several microorganisms, including fungi (Rabea *et al.*, 2003).

The use of chitosan is encouraged in many research areas, due to its biocompatibility, biodegradability and bioactivity. In agriculture, chitosan has shown to be effective to elicit plant defense mechanisms, thus enhancing resistance to pathogens due to the synthesis of plant proteins. This effect is enhanced with an increase of the production of antifungal compounds such as phytoalexin and pisatin, as well as hydrolytic enzymes such as chitinases and glucanases (Rabea *et al.*, 2003). The antimicrobial activity of chitosan varies with the degree of acetylation (DA), molecular weight ( $M_w$ ), distribution of the pendant acetyl groups as well as its conformational structure (Tsai *et al.*, 2002). It has been reported that this biological activity is due to the amino groups in its polycationic form at pH below 6, which is able to interact with the negatively charged microbial cell membrane thereby producing permeability changes, as well as binding water and trace metals (Devlieghere *et al.*, 2002). On the other hand, the preparation methods of chitosan affect DA and  $M_w$ , since high amount of alkali is used for deacetylation process, which promotes depolymerization as drawback.

The use of bioactive coatings composed of the yeast *Candida saitoana* as biological control agent and chitosan or its derivatives have been proposed as effective alternatives to chemical fungicides in apple and citrus fruit during postharvest (Capdeville *et al.*, 2002; El-Ghaout *et al.*, 2000) *Candida guillermundii* and its teleomorph *Pichia guillermundii* are natural antagonists of many phytopathogenic fungi; thereby they have been targeted as potential antagonists against *P. digitatum* (Droby *et al.*, 2002; Raymond 1994). Despite of these reports there is no information, at least to the best of our knowledge, on the evaluation of combined applications of chitosan and *P. guillermundii* to control the phytopathogenic fungi *P. digitatum*. The aim of this work was to study in vitro the effect of DA and  $M_w$  of chitosans on the growth of *P. digitatum* in combination with the biocontrol yeast *P. guillermundii*.

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Materials

Chitin was purified from lactic acid fermentation of shrimp heads (*Litopenaeus sp.*). The obtained raw chitin was treated with 0.5N of HCl and 0.4N NaOH [9] (Table 4.1). These chitins were used for the preparation of chitosans by roomtemperature-homogeneous-deacetylation (RTHD) with alkali (65% w/v) (LB-I) (Ramirez-Coutiño *et al.*, 2006) and by freeze-pump-out-thaw-cyclesheterogeneous-deacetylation (FPT) with alkali (50% w/v) (LB-II) (Lamarque *et al.*, 2005). Commercial chitosans, Fluka and Kitomer, were used in this study. The Kitomer sample was deacetylated three times with FPT cycles.

### 4.2.2 Chitin and chitosan characterization

The determination of DA of chitosans were carried out by  $H^1$  nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $H^1$ NMR), the spectra were recorded on a Bruker AC 200 spectrometer (200MHz for  $H^1$ ) at 25 °C (Hirai *et al.*, 1991). Chitosans samples were dissolved in buffer of acetic acid (0.2 M)/ammonium acetate (0.15 M) and analyzed by size exclusion chromatography (SEC) for determination of molecular weights ( $M_w$ ). SEC was equipped with an IsoChrom LC pump connected to a protein pack glass 200 SW column packed with TSK gel 6000 PW. The refractive index increment  $dn/dc$  ranged from  $0.183 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  to  $0.190 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  were determined by a differential refractometer (Waters 410) operating at 632.8 nm (Lamarque *et al.*, 2005). Chitins

were solubilized in N,N-dimethylacetamide containing 5% lithium chloride. The average  $M_w$  of chitins was determined using an automatic capillary viscometer (Viscologic TI 1 SEMATech), the parameters of Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada employed were  $\alpha = 0.69$  and  $K = 2.4 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$  (Lamarque *et al.*, 2005).

**Table 4.1** Molecular weight ( $M_w$ ) of the chitins obtained by fermentation and further used for preparation of chitosans

Chitins	$M_w (\times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1})$	Deacetylation process	Chitosan code
Chitin - I	$360 \pm 0.7$	RTHD	LB-I
Chitin - II	$930 \pm 0.6$	FPT	LB-II

<sup>a</sup> Determined by viscometry in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride.

### 4.2.3 Microorganisms

*P. guillermoidii* was isolated from the surface of Valencia orange (*Citrus sinensis*) and Italian lemon (*Citrus limon* var. *Eureka*) of Nuevo Padilla (Tamaulipas, México). The microorganisms were cultivated in dextrose sabouraud broth at 30 °C. Inocula of  $1 \times 10^8$  cells·mL<sup>-1</sup> were prepared for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosans. Subsequently, *P. guillermoidii* ( $1 \times 10^3$  cells·mL<sup>-1</sup>) was inoculated for the evaluation assays of interaction among chitosans at the MIC with *P. digitatum*. The moulds were cultivated in potato dextrose agar (PDA) at 30 °C for 5 days. The spores were harvested in a sterile solution 0.1% v/v of Tween 80 using a magnetic agitation. Spore concentration was counted in a Neubauer chamber and it was adjusted to  $1 \times 10^6$  spores·mL<sup>-1</sup> concentration for determination of MIC and also it was adjusted to  $1 \times 10^3$  spores·mL<sup>-1</sup> for assessing percentages of spore germination (SG%) and radial growth (RG).

### 4.2.4 Determination of the minimum inhibitory

Concentrations (MIC), the radial growth (RG) and the spore germination (SG) assays Several chitosan concentrations (0.6 g·L<sup>-1</sup>, 1.2 g·L<sup>-1</sup>, 2.5 g·L<sup>-1</sup> and 3 g·L<sup>-1</sup>) were added to nutrient yeast extract dextrose agar (NYDA) in plates for determination of

MIC of *P. digitatum* and *P. guillermoidii*. RG was measured daily in agar plates in the presence and in the absence of yeast. The results were compared with the control and expressed as a percentage of radial inhibition (RI%) according to Eq. (4.1) (Plascencia *et al.*, 2003). The inhibition of spore germination was determined in nutrient yeast extract-dextrose broth (NYD), with or without inoculation of *P. guillermoidii*, at 30°C during 48 h, the percentages of spore germination inhibition (SGI%) were also determined from the following equation:

$$I(\%) = \left[ \frac{c - i}{c} \right] \times 100 \quad (4.1)$$

Where I is the radial inhibition (RI) or spore germination inhibition (SGI), c the radial growth in the control ( $R_c$ ) or spore germination in the control ( $SG_c$ ) and i is the radial growth in the treatment ( $R_i$ ) or spore germination in the treatment ( $S_i$ ). Radial rates ( $k_R$ ) and maximal radial growth ( $RG_{max}$ ) were estimated by the logistic model (Eq. (4.2)) using the program STATISTICA (StatSoft, Inc.). The spore germination rates ( $k_{SG}$ ) and maximal spore germination ( $SG_{max}$ ) were also determined by the following equation:

$$y = \frac{a}{1 + \left( \frac{a - b}{b} \right) e^{-cx}} \quad (4.2)$$

Where b is the initial percentage of radial growth ( $RG_0$ ) or the initial percentage of spore germination ( $SG_0$ ), c the radial growth rate ( $k_R$ ) or the spore germination rate ( $k_{SG}$ ) and a is the maximal radial growth ( $RG_{max}$ ) or the maximal spore germination ( $SG_{max}$ ).

#### 4.2.5 Scanning electron microscopy

The yeast was cultivated in NYDA plates (control) or with the addition of LB-I chitosan at  $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Samples were cut into cubes of  $1 \text{ cm}^2$ . The cubes were immersed in 5% (v/v) glutaraldehyde for 24 h at 4 °C and post-treated with  $\text{OsO}_4$  1% (w/v) for 2 h at 4 °C. Then they were dehydrated in a graded alcohol series and

covered with carbon and gold prior to examination in the scanning electron microscope (JEOL JSM-5900 LV, Tokyo).

#### 4.2.6 Statistical analyses

A randomized design was carried out in quadruplicate for experiments with several chitosan concentration, chitosan samples and yeast addition in the inhibition of spore germination and radial growth. The programme SPSS version 8.0 (SPSS, Inc., USA 1997) computed the analysis of variance with percentages of radial inhibition (RI%) and spore germination inhibition (SGI%) as response variables. The means were compared with Tukey Kramer multiple means comparison test ( $P < 0.05$ ).

### 4.3 Results and discussion

The  $M_w$  of the chitins used in this work was characterized as it has a direct influence on the final molecular weight of the resulting chitosans (Table 4.2). The characterization of chitosans showed that the highest DA (40%) was obtained by the FPT (LB-II) with a  $M_w$  of  $400 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  from the Chitin- II ( $M_w$  of  $930 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Chitosan obtained by the RTHD from chitin LB-I showed a DA of 33.75% and the lowest  $M_w$  ( $107 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) (Table 4.3). The lowest DA (0.68%) was obtained after three deacetylation cycles by the FPT method on a commercial chitosan sample (Kitomer) from an initial DA of 14% and  $M_w$  of  $416 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . The lowest DA chitosan resulted in only a 23.31% reduction of  $M_w$  (Table 4.2). The chitosan obtained by homogeneous deacetylation (RTHD) exhibited 70.3% of reduction in molecular weight from the initial chitin employed for the process (Chitin-I); whereas  $M_w$  of the chitosan prepared by heterogeneous deacetylation (FPT) was decreased up to 57% regarding to the  $M_w$  of its precursor Chitin-II. Several factors such as the presence of oxygen in the deacetylation process and the chitin dissolution in alkaline media at room temperature might promote the biopolymer degradation. Lamarque et al. (2005) have explained that the absence of oxygen during heterogeneous deacetylation by means of freeze-pump-out-thaw-cycles (FPT) decreased the alkaline degradation of chitosan, thus preventing a drop in the  $M_w$  value. Additionally, Nemtsev *et al.* (2002) reported a low reduction in  $M_w$  in the chitin deacetylation in homogeneous conditions after alkaline chitin swelling at low temperature.



**Table 4.2** Degree of acetylation (DA) molecular weight ( $M_w$ ) and minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosans determined in NYD agar for yeasts and moulds at 48 h and 30 °C

Sample	Deacytilation method	DA (%)	$M_w$ ( $1 \times 10^3$ g·mol <sup>-1</sup> )	MIC yeast (g·L <sup>-1</sup> )	MIC mould (g·L <sup>-1</sup> )
Commercial <sup>a</sup>	FPT <sup>b</sup>	0.68	319±0.005	0.6	2.5
Commercial <sup>c</sup>	Commercial	>10 <sup>d</sup>	550 <sup>d</sup>	0.6	3.5
Commercial <sup>e</sup>	Commercial	>10 <sup>d</sup>	416±0.007	1.2	3.5
LB-I	RTHD	33.8	107±0.005	2.5	2.5
LB-II	FPT	40.7	400±0.007	3	3.5

<sup>a</sup> Kitomer medium molecular weight.

<sup>b</sup> Three deacetylations with FPT cycles.

<sup>c</sup> Fluka Biochemika high molecular weight.

<sup>d</sup> Values reported by the manufacturer.

<sup>e</sup> Fluka Biochemika medium molecular weight.

### 4.3.1 Minimum growth inhibitory concentrations (MIC)

The MICs of chitosans for several fungi have been reported in a wide range of concentrations and depends on extrinsic factors such as pH, water activity and nutrient content of the media, as well as inherent characteristics of the chitosan such as, degrees of acetylation and polymerization (Rabea *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2002). Therefore, MIC for moulds and yeasts were determined in order to select the suitable concentration regarding the different response of the targeted microorganisms to chitosan. It was desirable that the biopolymer concentration allow the yeasts to grow and also inhibit moulds.

The determination of the MICs of chitosans with different DAs and  $M_w$  over the moulds and yeasts are shown in Table 4.2. The yeast, *P. guilliermondii*, was more sensitive to the biopolymer than the mould. On the other hand, low DA increased significantly ( $P < 0.05$ ) the yeast inhibition, hence the MIC decreased. This could be explained by the availability of increased amino groups interacting with the cell walls in these low DA chitosans, thus enhancing their antimicrobial activities (Tsai *et al.*, 2002). These results are in agreement with those reported by Tsai *et al.* (2002), who observed low concentrations values of the minimum lethal inhibition with low DA chitosans. On the other hand, the high  $M_w$  chitosans ( $400 \times 10^3$  g·mol<sup>-1</sup> and  $550 \times 10^3$  g·mol<sup>-1</sup>) showed higher MICs against moulds (3.5 g·L<sup>-1</sup>) than those with low  $M_w$  (MIC

2.5 g·L<sup>-1</sup>). This chitosan concentration is in agreement with a previous report [3] where the MIC for different fungi ranged within 0.01 g·L<sup>-1</sup> and 5 g·L<sup>-1</sup> have been tested. The increment of deacetylation of the chitosan improved the antimicrobial activities against the yeast. It has also been reported that high deacetylated chitosan (6% DA) and low  $M_w$  ( $43 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup>) was inhibitory for *Candida lambica* at MIC of 1g·L<sup>-1</sup> (Devlieghere *et al.*, 2002). According to our results on the antimicrobial activity (Table 5.2) and those reported elsewhere, LB-I chitosan with  $M_w$  of  $107 \times 10^3$  g·mol<sup>-1</sup> (DA= 33.75%) and LB-II with a  $M_w$  of  $400 \times 10^3$  g·mol<sup>-1</sup> (DA= 40.7%) were then considered as the most suitable to interact with the microorganisms, with emphasis in yeast survival and fungal inhibition.

#### **4.3.2 Determination of the radial growth (RG) and the radial inhibition (RI%) of *P. digitatum***

The radial growth was 100% inhibited for all the LB-I chitosan concentrations during the first 48 h with or without yeast. After 120 h the inhibition was significantly reduced at the highest chitosan concentration (3 g·L<sup>-1</sup>), which was only of 26.64 RI% (Table 4.3). This suggested that chitosan was mainly effective during the adaptation phase. This delay of the lag phase has been explained by the higher fungistatic activity of chitosan during the spore germination due to the biopolymer interaction with cell wall of the conidia (Plascencia *et al.*, 2003). Besides, the addition of yeast resulted in the highest RI% values at 120 h. When both chitosans were compared, the LB-I showed a lower RI% than LB-II at a concentration of 2.5 g·L<sup>-1</sup>, whereas the addition of yeast significantly increased the RI% with LB-I chitosan up to 71% with a biopolymer concentration of 1.2 g·L<sup>-1</sup>. This experimental observation suggested the competition between yeasts and moulds for nutrients along with the interaction of the yeast and the hyphae. This is in agreement with previous work reported by Capdeville *et al.* (2002), where additive effects on *Penicillium expansum* were detected when using a combination of chitosan (10g·L<sup>-1</sup>) with *C. saitoana* as antagonist, whereas in the case of only chitosan this effect was not evidenced (Capdeville *et al.*, 2002). On the contrary herein for LB-II chitosan, the addition of yeast did not affect the inhibition because the biopolymer possesses an antimicrobial effect against the yeast and therefore its role as antagonist was prevented (Table 4.3).

The maximum radial growth values ( $RG_{max}$ ) decreased in the presence of chitosan LB-I and LB-II ( $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 27.35% and 38.4%, respectively, as compared to the control. On the basis of yeast addition, the  $RG_{max}$  was reduced until 57%, as well as the radial growth rates ( $k_R$ ) were reduced from  $0.091 \text{ h}^{-1}$  to  $0.082 \text{ h}^{-1}$  (Table 6.3). The  $k_R$  decreased at all proportions with LB-II chitosan concentrations and the lowest  $k_R$  was observed with the same concentration of chitosan,  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Table 4.3).

The chitosan sample with  $M_W 400 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  showed the highest inhibition effect for yeast thus preventing its interaction with fungus. In addition, the use of yeast combined with the low molecular weight chitosan (LB-I) was significantly effective on inhibiting the fungus radial growth. In this sense, LB-I chitosan attained similar inhibition at lower concentration ( $10^3 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) than those reported in the literature (from  $10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  to  $10^8 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Arras *et al.*, 2002; Droby *et al.*, 2002; Capdeville *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 1999).

**Table 4.3** Percentage of radial inhibition (RI%) and kinetics parameters of radial growth of *Penicillium digitatum* estimated with logistic model at different concentrations of chitosan with and without inoculation of *Pichia guillermoidii*

Chitosan ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Chitosan LB-I ( $107 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )				chitosan LB-II ( $400 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )			
	RI % 5 días	$K_R (\text{h}^{-1})$	$RG_{max}$	$R^2$	RI % 5 días	$K_R (\text{h}^{-1})$	$RG_{max}$	$R^2$
0	0a	0.09	14.9	0.98	0a	0.09	14.9	0.98
0.615	$7.1 \pm 0.75^b$	0.15	13.3	0.97	$1.8 \pm 0.25^b$	0.07	14.6	0.98
1.2	$13.4 \pm 0.89^c$	0.14	12.5	0.98	$7.5 \pm 0.49^c$	0.07	13.8	0.97
2.5	$15.0 \pm 0.47^c$	0.11	12.5	0.98	$53.6 \pm 0.35^{ef}$	0.07	7.2	0.96
3	$26.6 \pm .77^d$	0.10	10.8	0.97	$43.6 \pm 0.86^{ef}$	0.06	9.2	0.96
0 + yeast	$57.0 \pm .48^h$	0.08	6.4	0.97	$57.0 \pm 0.48^{ef}$	0.08	6.4	0.97
0.615+ yeast	$36.1 \pm 0.98^e$	0.07	9.8	0.97	$5.2 \pm 0.55^b$	0.08	14.1	0.98
1.2 + yeast	$55.9 \pm 0.74^{fgh}$	0.14	6.5	0.98	$17.5 \pm 0.42^c$	0.12	12.4	0.99
2.5 + yeast	$54.6 \pm 0.73^{gh}$	0.09	7.0	0.98	$34.7 \pm 0.92^{cd}$	0.06	10.7	0.96
3+ yeast	$48.5 \pm 0.95^{fg}$	0.12	7.7	0.99	$42.3 \pm 0.84^{cd}$	0.07	8.9	0.97

Values in a column with the same letter are not significantly different at  $P \leq 0.05$  determined by multiple comparison of means by Tukey's test.

### 4.3.3 Inhibition of spore germination (SGI) of *P. digitatum*

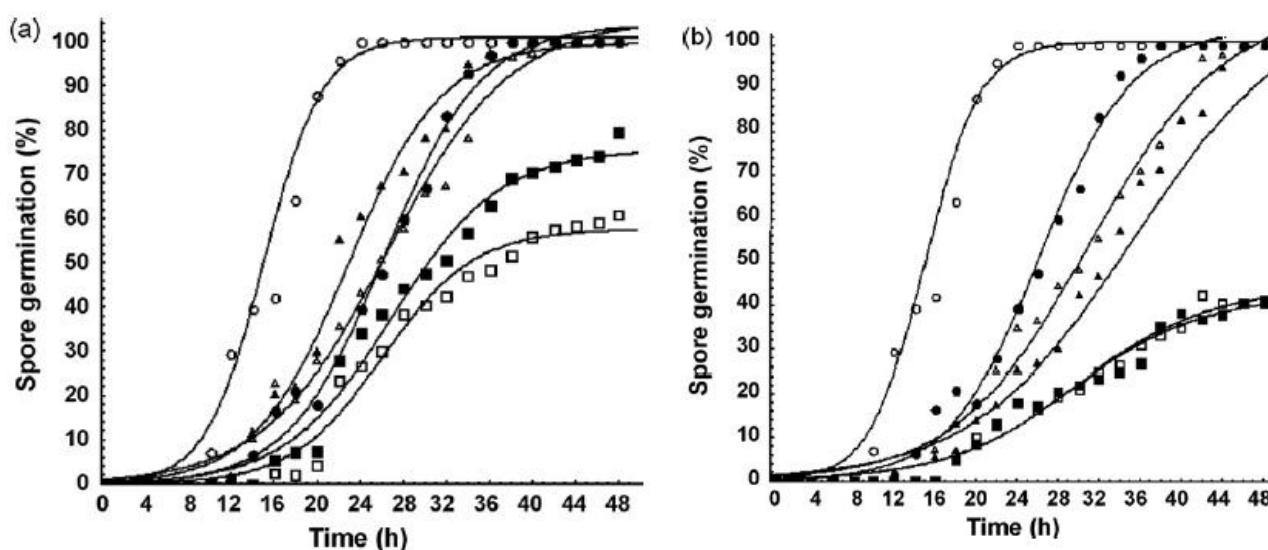
The presence of yeast in the media without chitosan decreased the germination rate of *P. digitatum* from  $0.372\text{ h}^{-1}$  to  $0.224\text{ h}^{-1}$ . As well, both LB-I and LB-II chitosans diminished the germination rates when they were evaluated with the presence of yeast or without it. The lowest spore germination rates ( $k_{SG}$ ) were estimated for concentrations of  $1.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of LB-II chitosans without yeast. The values were  $0.153\text{ h}^{-1}$  and  $0.156\text{ h}^{-1}$ , for the  $1.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

Although the presence of yeast mixed with chitosan in the media increased the germination rates, the maximum germination  $SG_{max}$  did not show significant variations; for instance, the  $SG_{max}$  was 44% at  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  without yeast and 42% with yeast. For LB-I chitosan, the highest reduction in the  $SG_{max}$  was attained at  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  without yeast (57%) (Table 4.4). It is noteworthy that the presence of chitosan not only reduced the germination rates but also decreased the  $SG_{max}$  at concentrations of  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . It has been reported that chitosan becomes more available in solution as the interactions between the charges of the  $-\text{NH}_3^+$  groups with the negative charges in the cell membrane alter its permeability, thereby spore germination is retarded (Rabea *et al.*, 2003; Devlieghere *et al.*, 2002). LB-II chitosan at concentration of  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  produced more than 95% SGI at 12 h for all treatments, 82% SGI at 24 h and 59.5% SGI at 48 h. The presence of yeast had no effect on the SGI values (Figure 4.1). The structural changes in the moulds caused by chitosan, such as abnormal swelling of the spores, could induce the lag phase delay that was observed in this study. On the other hand, clear zones in NYDA with added chitosan were observed when *P. guilliermondii* and *P. digitatum* were inoculated. This may be an indication of adaptation mechanism in moulds, such as the induction of chitinases or chitosanases as a consequence of the interaction chitosan–mould–yeast, since they compete for the readily available carbon source, thus this might reduce the inhibitory effect of chitosan during fungal apical growth.

**Table 4.4** Percentage of spore germination inhibition (SGI%) and kinetic parameters of germination of *P. digitatum* estimated by logistic model and determined at different concentrations of chitosans with and without inoculation of *P. guillermoidii*

Chitosan (g·L <sup>-1</sup> )	LB-I Chitosan (107x10 <sup>3</sup> g·mol <sup>-1</sup> )					LB-II Chitosan (400x10 <sup>3</sup> g·mol <sup>-1</sup> )				
	SGI %		$K_{SG}$ (h <sup>-1</sup> )	SG <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>	RI % 5		$K_{SG}$ (h <sup>-1</sup> )	SG <sub>m</sub> ax	R <sup>2</sup>
	12h	24h				12h	24h			
0	100	0a	0.37	100	0.99	100	0a	0.37	100	0.99
1.2	100	56.5 ± 0.71 <sup>c</sup>	0.22	106	0.98	100	65 ± 0.71 <sup>c</sup>	0.15	108	0.97
2.5	100	73.5 ± 0.4 <sup>e</sup>	0.24	57	0.98	100	82 ± 1.41 <sup>e</sup>	0.16	44	0.98
0 + yeast	95±0.9	60.5 ± 1.1 <sup>c</sup>	0.22	104	0.97	95	60.5 ± 1.1 <sup>b</sup>	0.22	104	0.97
1.2 + yeast	100	39.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.23	99	0.98	100	74.5 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.18	111	0.96
2.5 + yeast	100	66 ± 1.06 <sup>d</sup>	0.20	75	0.97	100	82 ± 0.35 <sup>e</sup>	0.16	42	0.98

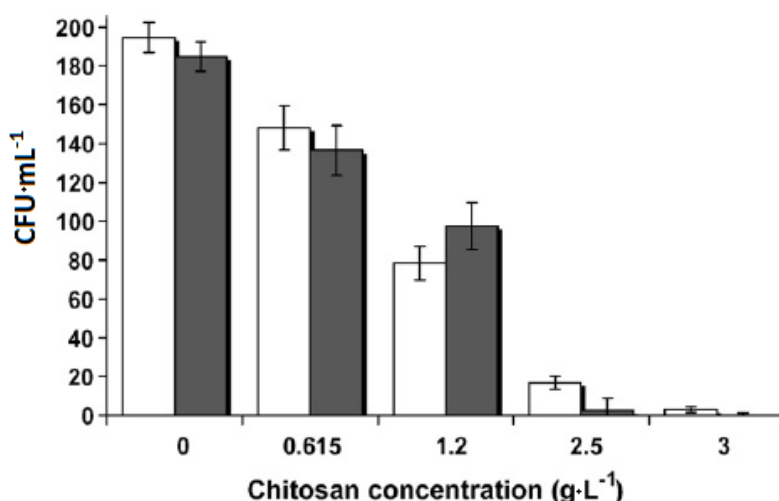
Values in a column with the same letter are not significantly different at  $P \leq 0.05$  determined by multiple comparisons of means by Tukey's test.



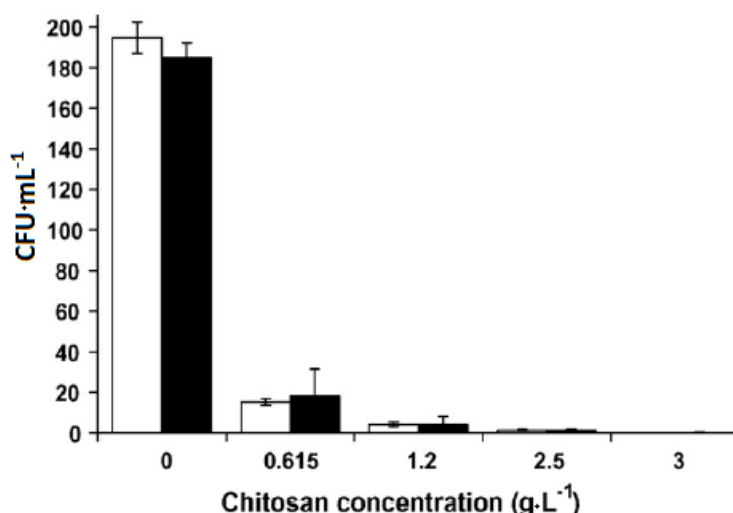
**Figure 4. 1** Spore germination of *Penicillium digitatum* in control medium (○), con *Pichia guillermoidii* (●), with added (a) LB-I chitosan and (b) LB-II chitosan at concentrations of 1,2 g·L<sup>-1</sup> (Δ) and 2,5 g·L<sup>-1</sup> (□) of chitosan or in combination with yeast 1,2 g·L<sup>-1</sup> (▲), 2,5 g·L<sup>-1</sup> (■).

#### 4.3.4 Determination of inhibition of *P. guilliermondii*

The inhibition percentages due to the effect of chitosans on the yeast were evaluated as the number of colony forming units (CFU·mL<sup>-1</sup>) in comparison with a control (non-added chitosan) at 96 h (Figures. 4.2 and 4.3). The inhibition increased when chitosan was added and a maximum of 98% was attained with 3 g·L<sup>-1</sup> biopolymer concentration. This shows similar behavior to that observed with MIC determinations, where growth of the yeasts was not evidenced at concentrations above 2.5 g·L<sup>-1</sup> (Table 4.2). These results are in agreement with higher sensitivity of the yeasts towards chitosan than moulds (Figures. 4.2 and 4.3). These results ruled out that chitosan and glycolchitosan are not inhibitory for the growth of the yeast *C. saitoana* as reported by other authors (Capdeville *et al.*, 2002; El-Ghaout *et al.*, 2000). The chitosan–mould–yeast interactions assays indicated a strong decrease in the growth of the yeasts. This was in agreement with Sagoo *et al.* (2002) who claimed that chitosan glutamate was inhibitory for food spoilage yeasts, *Saccharomyces exigus*, *Sacharomycodes ludwigii* and *Torulaspora delbrueckii*. The yeasts were able to grow with LB-I chitosan at < 1.2 g·L<sup>-1</sup>, however they were inhibited at higher concentrations.

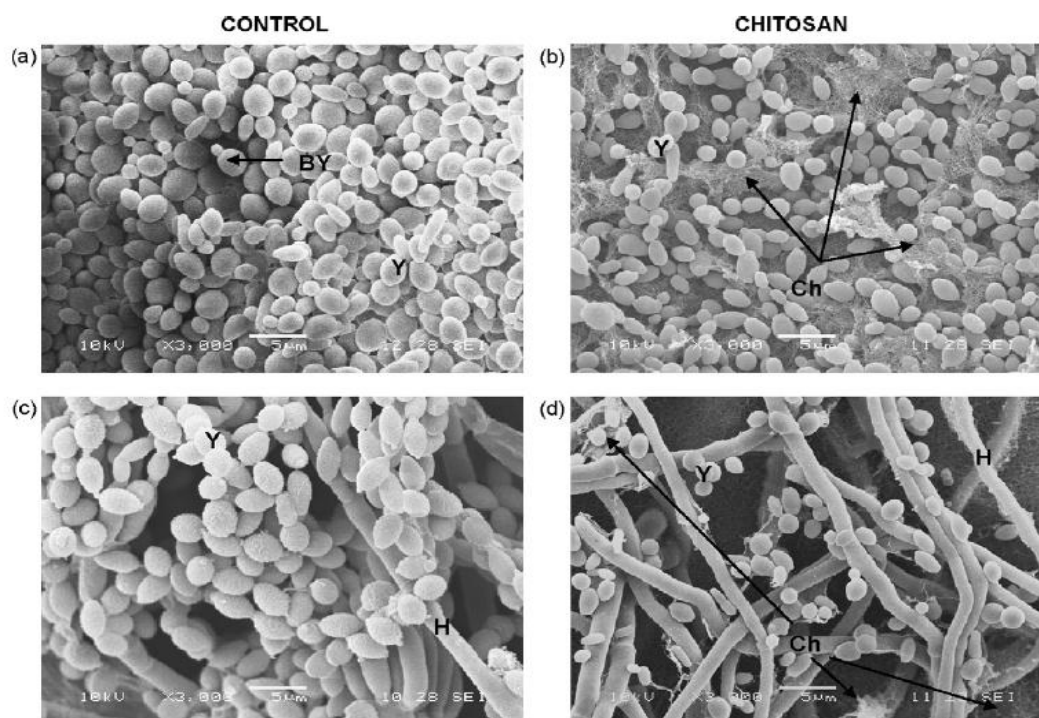


**Figure 4. 2** *P. guilliermondii* growth determined at several LB-I chitosan ( $107 \times 10^3$  g·mol<sup>-1</sup>) concentrations (□) or in presence of mould (■) after 96h of incubation.



**Figure 4. 3** *P. guillermoidii* growth determined at several LB-II chitosan ( $400 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) concentrations (□) or in presence of mould (■) after 96h of incubation.

LB-I chitosan was significantly less inhibitory than LB-II chitosan, as it can be observed in Figures. 6.2 and 6.3. SEM analysis showed a decrease in the number of yeasts in the media with added chitosan LB-I at  $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $107 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) in comparison to the control (Figure. 4.4 a and b). On the other hand, the interaction with the yeasts was detected when *P. digitatum* was present, since yeasts adhered to the surface of the fungal hyphae limiting their growth (Figure. 4.4c). In the combined treatment, chitosan–mould–yeast, a smaller number of cells of *P. guillermoidii* grew on the hyphae of *P. digitatum*, which also presented a lower growth with chitosan (Figure. 4.4 c and d).



**Figure 4. 4** Scanning electron micrographis of *P. guillermoidii* growth in NYDA after 96h of incubation (magnification  $\times 1000$ ): controls (a) yeast and (c) interacting with *P. digitatum*. Chitosan ( $107 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) at concentration of  $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ : (b) yests and (d) interacting with *P. digitatum*. Ch = chitosan, H = hypha, Y = yeast and BY = budding yeast.

## 4.4 Conclusion

Our results showed that the different methods of chitosan preparation had a significant effect on the DA and  $M_W$  of the resulting biopolymers and thereby, their antimicrobial activities versus *P. digitatum*. The use of *P. guillermoidii* in combination with a relatively low  $M_W$  chitosan ( $107 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) improved the fungal growth inhibition, and therefore, this chitosan can be formulated with these yeasts as a reliable method for the biocontrol against *P. digitatum* on post-harvested fruits.

## Acknowledgements

The authors thank CONACyT-SAGARPA (2003-C01-8) for research funding and the European Union (Alfa Polylife) for granting Miss Pacheco during training in the Laboratoire des Matérieux Polymères et des Biomatériaux at Université Lyon I.



---

# CAPÍTULO CINCO :

## DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

---

### 5.1 Discusión general

La evaluación de la temperatura en la fermentación ácido láctica de una mezcla de desechos de camarón para la recuperación de quitina descrita en el capítulo 2, indicó que temperaturas entre 30 - 40°C favorecen la acidificación, los porcentajes de  $D_{\text{MIN}}$  más altos fueron estimados entre 27 - 36°C con producciones de ácido láctico superiores a  $0.319 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , el mayor crecimiento de bacterias lácticas y la máxima  $D_{\text{PROT}}$  se observó entre 30 - 45°C y la máxima recuperación de astaxantina libre entre 20 - 30°C. Los resultados experimentales de  $D_{\text{MIN}}$  permitieron ajustar un modelo polinomial de segundo orden que describe la evolución de la  $D_{\text{MIN}}$  en función de la temperatura y ATT. Los resultados de  $D_{\text{PROT}}$  indicaron que el proceso es llevado a cabo por proteasas de *L. plantarum* (Mathieus *et al.*, 2004) y enzimas endógenas del camarón (Oh *et al.*, 2000; Gordon, 2005).  $D_{\text{MIN}}$  y  $D_{\text{PROT}}$  superiores al 80% sin adición de ácidos orgánicos fueron relativamente más altos a los reportados en la literatura (Rao *et al.*, 2000; Braskar; Cira *et al.*, 2002) sugieren que el diámetro de poro (4mm) del filtro, que separa las dos fracciones en el reactor, permitieron una

mayor remoción de los minerales y proteínas. La energía de activación para las BAL obtenida a partir del modelo de Arrhenius fue de  $43 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ , los valores cardinales de temperatura en el desecho obtenidas por el modelo de Ratkowsky fueron  $T_{\max} = 324.85 \text{ K} + 1.37 (51.69 \text{ }^{\circ}\text{C})$  y  $T_{\min} = 277.1 \text{ K} + 2.52 (3.94^{\circ}\text{C})$ , similares a las reportadas por Zwietering *et al.* (1994).

Cinéticas de acidificación,  $D_{\text{MIN}}$ ,  $D_{\text{PROT}}$  y crecimiento microbiano durante la fermentación de desechos de camarón de la especie *Litopenaeus vanameii* con un tamaño de partícula de 1mm mostraron la posible disminución del tiempo de fermentación. Parámetros de acidificación superiores a los obtenidos sobre la mezcla de desecho (capítulo 2) y reportados previamente (Cira *et al.*, 2002) fueron observados. La máxima actividad proteolítica se obtuvo durante las primeras 48h, tiempo en el cual las BAL alcanzaron la fase estacionaria, lo que podría estar ligado a la producción de enzimas de *L. plantarum* necesarias para hidrolizar las proteínas y favorecer el aumento de la  $D_{\text{PROT}}$ . La determinación de  $D_{\text{MIN}}$  y  $D_{\text{PROT}}$  a lo largo de la cinética, indicó el tiempo mínimo necesario (96h) para alcanzar la máxima  $D_{\text{MIN}}$  y  $D_{\text{PROT}}$ . Los valores superiores al 90% sugieren el efecto del tamaño de partícula del desecho, que favoreció la solubilización de minerales y disponibilidad del sustrato por el aumento de la superficie de contacto, liberando al mismo tiempo la astaxantina, de la cual se obtuvieron concentraciones superiores a  $2400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que son mayores a las reportadas anteriormente (Gimeno *et al.*, 2007).

Después de eliminar el contenido residual de proteínas y minerales mediante un tratamiento químico menor, las muestras fueron caracterizadas, donde se observó la conservación del peso molecular, grado de acetilación e índice de cristalinidad, alcanzando valores superiores a los obtenidos en quitinas extraídas por métodos totalmente químicos.

Los resultados de la desacetilación química heterogénea indicaron 10% más de desacetilación en muestras de quitinas purificadas químicamente después de una primera etapa de desacetilación llegando a valores del 70%. Sin embargo, el  $M_w$  de muestras desacetiladas de quitina biológica fue mayor con respecto al de quitinas químicas. La diferencia en el DA y MW se debe a la estructural inicial de las quitinas. El análisis de difracción de rayos X indicó que durante la primera etapa de

desacetilación la estructura cristalina de la quitina fue conservada en las muestras desacetiladas a partir de BIO-chitin, sin embargo el grado de cristalinidad fue disminuyendo conforme al aumento en el tiempo de desacetilación. Para disminuir el DA, otra etapa de desacetilación fue necesaria. Al utilizar BIO-quitina parcialmente desacetilada por 20 min con  $M_W$  ligeramente elevado para el segundo ciclo de desacetilación, los quitosanos resultantes mostraron  $M_W$ s mayores que los reportados en la literatura (Tsaih *et al.*, 2002), con características de estructura cristalina conservada de la quitina. La quitina biológica mostró producir quitosanos con  $M_W$  elevado y alto grado de cristalinidad.

La purificación parcial de CDAs de *Colletotrichum gloeosporioides* mostró la posibilidad de obtener enzimas capaces de desacetilar hasta en un 20% quitinas provenientes de quitosanos reacetiladas o quitinas hidrolizadas de bajo  $M_W$ . Purificación parcial utilizando precipitación con sulfato de amonio e la utilización de FPLC con columna de Q sepharose indicó hasta un 50% de rendimiento en recuperación de la enzima y hasta una concentración de 35.4 veces. El extracto parcialmente purificado permitió obtener parámetros como concentración de enzima, sustrato y tiempo de reacción así como valores de  $K_M$  y  $V_{MAX}$ .

La evaluación de la actividad antimicrobiana de quitosanos obtenidos a partir de quitina semibiológica y con distintos pesos moleculares, solo o en combinación con un agente de biocontrol (*Pichia guilliermondii*) mostrado en el capítulo 4, indicó que el proceso de obtención de quitosano tiene un efecto en las propiedades finales del producto. El proceso homogéneo alcanzó mayor desacetilación (DA 33.75%) disminuyendo al mismo tiempo el PM en comparación al heterogénea (DA 40 %), lo que concuerda con lo reportado por Nemtsev *et al.*, (2002). Los análisis de concentraciones mínimas inhibitorias de los quitosanos evaluados contra *Pichia guilliermondii* y *Penicillium digitatum* indicaron que bajos grados de DA aumentan la actividad antimicrobiana contra la levadura y bajos  $M_W$  contra el hongo. Los quitosanos LB-I ( $107\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y DA de 33.7%) y LB-II ( $400\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y DA 40%) utilizados en los experimentos de inhibición radial y germinación de esporas de *P. digitatum* mostraron inhibición radial del 100% durante las primeras 48h cuando el hongo se encontraba en fase de adaptación, en presencia o ausencia de levadura, a las 120h el efecto de inhibición es ocasionado por las levaduras que compiten por nutrientes y

espacio lo que concuerda con Capdeville *et al.*, (2002). En cuanto a la germinación de esporas se observó un 100% de inhibición durante las primeras 12h y del 82% después de las 24 horas con el quitosano de mayor peso molecular, la inhibición obtenida en esta etapa puede deberse a la mayor disponibilidad del quitosano en el medio que favoreció la interacción de la carga positiva del polímero con las cargas negativas de la membrana celular retrasando la germinación (Plascencia *et al.*, 2003). Por otra parte los cambios estructurales del hongo causados por el quitosano pudieron ocasionar el retardo en el crecimiento apical al igual que la producción de enzimas como quitinasas y quitosanasas del hongo como consecuencia de la interacción quitosano-Levadura-hongo al competir por la fuente de carbono.

## 5.2 Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la temperatura, la utilización de solo una especie de camarón (*Litopenaeus vanameii*), así como un tamaño de partícula de 1mm, fueron factores importantes durante la extracción de quitina mediante fermentación ácido láctica de desechos de camarón. El modelo propuesto permite predecir  $D_{MIN}$  en función de la ATT y temperatura. Las cinéticas de  $D_{MIN}$  y  $D_{PROT}$  permitieron observar el tiempo en el que se alcanza la máxima remoción de minerales y proteínas así como la conservación de astaxantina libre y poder acortar el tiempo de fermentación. La fermentación ácido láctica de desechos de camarón, permitió la extracción de quitina mediante un método amigable con el medio ambiente, la utilización de un desecho como materia prima y favoreció la recuperación de compuestos de valor agregado como la astaxantina, aumentando los beneficios del proceso. A pesar de que un tratamiento químico menor fue necesario para producir quitinas con las cantidades de proteína y minerales aceptadas comercialmente, características como el peso molecular, grado de acetilación e índice de cristalinidad resultaron superiores que en muestras obtenidas por métodos totalmente químicos. Elevados pesos moleculares e índices de cristalinidad son características prometedoras de la quitina para usos posteriores.

En relación a la desacetilación heterogénea (FPT) de muestras de quitinas obtenidas mediante métodos biológicos, se observó que la alta cristalinidad y  $M_w$  de las quitinas biológicas, permitieron la obtención de quitinas parcialmente desacetiladas

con altos grados de desacetilación y conservación de la estructura cristalina, así como la obtención de quitosanos con  $I_{CR}$  elevado, haciéndolos resistentes a ataques enzimáticos.

En cuanto a la producción y purificación parcial de un extracto enzimático de CDAs, el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* fue capaz de producir CDAs que al ser parcialmente purificadas mediante precipitación con sulfato de amonio y el uso de una columna de intercambio iónico (Q-sepharose), mostraron poder ser concentradas hasta 35 veces (35 fold), con un rendimiento del 50%. Parámetros de desacetilación como concentración de sustrato, enzima y tiempo de reacción fueron obtenidos con quitas de DA 60%, obtenidas a partir de reacetilación de quitosanos. Las CDAs de *Colletotrichum gloeosporioides* fueron capaces de desacetilar quitinas hidrolizadas de bajo  $M_W$ .

En la obtención y aplicación del quitosano, los resultados mostraron que el método de preparación del quitosano tiene un efecto en el DA y  $M_W$  de los productos resultante y por consiguiente en su actividad antimicrobiana. El quitosano presentó un efecto inhibitorio mayor en la etapa de germinación de esporas solo o en presencia de la levadura debido a la interacción de la carga del biopolímero con la membrana celular de los microorganismos. La levadura (*P. guilliermondii*) mostró mayor efecto en la etapa de crecimiento radial en ausencia del quitosano. El uso combinado de quitosano de bajo  $M_W$  ( $107 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y levadura *P. guilliermondii* se proponen como candidatos en formulaciones contra *P. digitatum* en frutos postcosecha.

### 5.3 Perspectivas

Debido a que el proceso de recuperación biológica de quitina estudiado en el presente trabajo no alcanza la remoción total de minerales y proteínas, una de las perspectivas es la mejora del proceso para alcanzar la total  $D_{MIN}$  y  $D_{PROT}$ . Dentro de las posibles opciones a utilizar se encuentran la adición de enzimas proteolíticas durante el proceso de fermentación o posteriores a ésta. Cofermentaciones en las que uno de los microorganismos produzca enzimas proteolíticas. Aplicación de un sistema en continuo en el que se adicione fuente de carbono y/o microorganismos para aumentar la producción de ácido láctico favoreciendo la  $D_{MIN}$ . Análisis de

actividad proteolítica de enzimas producidas por la bacteria podrían evaluarse para determinar temperatura y pH óptimos que favorezcan la  $D_{\text{PROT}}$ . La adición de enzimas desacetilasas en el proceso de recuperación de quitina podrían al mismo tiempo comenzar a desacetilar parcialmente favoreciendo la eliminación de residuos de proteína y minerales covalentemente ligados a la molécula de quitina.

Por otra parte modificaciones físicas de la materia prima como reducción del tamaño de partícula o el efecto de sonicación a una determinada longitud de onda incrementarían la  $D_{\text{MIN}}$  y  $D_{\text{PROT}}$  de los desechos de camarón. En cuanto a la desacetilación enzimática de la quitina, la purificación total de la enzima permitiría inmovilizarla o reutilizarla subsecuentemente sobre la misma quitina. Modificaciones físicas de la estructura cristalina podrían aumentar la desacetilación.

---

# REFERENCIAS

---

- Aidoo**, K. E., Henry, B. and Wood, J. B. (1982). Solid state fermentation. *Advances of Applied Microbiology*. **28**: 201-237.
- Alfonso**, C., Nuero, O. M., Santamaría, F. and Reyes, F. (1995). Purification of a Heat-Stable Chitin Deacetylase from *Aspergillus nidulans* and Its Role in Cell Wall Degradation. *Current Microbiology*. **30**: 49-54.
- Allan**, C. R. and Hadwiger, L. E. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.*, **3**: 285–287.
- Araki**, Y. and Ito, E. (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *Eur. J. Biochem.* **55**, 71-78(1975).
- Arras**, G., Schem, B. and Migheli, Q. (2002). Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* Against Post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocontrol Science and Technology*. **12**:547-553.
- Aye**, K. N., Karuppuswamy, R., Ahamed, T. and Stevens, W. F. (2006). Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresource Technology*. **97**: 577-582.
- Axelsson**, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology (1993). Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. Editors.
- A.O.A.C.** 1980. Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bautista** J., Jover, M., Gutierrez, J.F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E., Iglesias, F. and Vega, J. (2001). Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. *Process Biochem.* **37**: 229–234.
- Beaney**, P., Lizardi-Mendoza, J. and Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **80** (2): 145-150.

- Bustos**, R. O., Romo, C. R. and Healy, M. G. (1994). Stabilisation of Trypsin-Like Enzymes from Antarctic Krill: Effect of Polyols, Polysaccharides and Proteins. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **65**: 193-199.
- Bhaskar**, N., Suresh, P.V., Sakhare, P.Z. and Sachindra, N.M. (2007). Shrimp biowaste with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization and carotenoid recovery. *Enzyme Microb. Tech.* **40**: 1427–1434.
- Binias**, D., Boryniec, S. and Binias, W. (2005). Studies of the structure of polysaccharides in the process of alkaline treatment of dibutylchitin fibres. *Fibres and textiles in Eastern Europe.* **13** (5): 137-140.
- Bjerkeng**, B. and Berge, G.M., (2000). Apparent digestibility coefficients and accumulation of astaxanthin E/Z isomers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) *Comp. Biochem. Phys. B.*, **127**: 423–432.
- Black**, M.M. and Schwartz, A.M., (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst.* **75**: 185–189.
- Blackwell**, J. and Weih, M.A. (1980). Structure of protein chitin complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarhyssa*. *Journal of Molecular Biology.* **137**: 49-60.
- Britton**, G., Weesie, R.G., Askin, D., Warburton, J.D., Gallardo-Guerrero, L., Jansenb, F.J., Grootb, H., Lugtenburgb, J., Cornardc, J.P. and Merlin, J.C. (1997). Carotenoid blues: structural studies on carotenoproteins. *Pure Appl. Chem.*, **69**: 2075– 2084.
- Capdeville**, G., Wilson, C. L., Beer, S. V., and Aist, J. R. (2002). Alternastive disease Control agents induce resistance to blue Mold in Harvested “red Delicious”. *Apple fruit Phytopathology.* **92**: 900-908.
- Carr**, F.J., Chill, D. and Maida, N., (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, **28**: 281–370.
- Chebotok**, E. N., Novikov, V. Yu., and Konovalova, I. N. (2007). Kinetics of base deacetylation of chitin and chitosan as influenced by their crystallinity. *Russian Journal of Applied Chemistry.* **80**: 1745 – 1758.
- Choorit**, W., Patthanamane, W. and Manurakchinakorn, S., (2008). Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. *Biores. Technol.* **99**: 6168–6173.
- Cai**, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J. and Kennedy, J. F. (2006). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydrate Polymers.* **65**: 211-2117.
- Cira**, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. and Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem.* **37**: 1359–1366.
- Cremades**, O., Ponce, E., Corpas, R., Gutieérrez, J.F., Jover, M., Alvarez- Ossorio, M.C., Parrado, J. and Bautista, J. (2001). Processing of crawfish (*Procambarus clarkii*) for the preparation of carotenoproteins and chitin. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 5468–5472.
- Degim**, Z., Celebi, N., Sayan, H., Babul, A., Erdogan, D. and Take, G. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino acids.* **22**: 187-198.
- Devlieghere**, F., Vermeulen, A. and Debevere, V. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* **21**: 703–714.
- Duarte** De Hollanda, H. and Netto F. M. 2006. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology.* **71**: 298-303.
- Domard**, A. (1989). Physicochemical properties of chitinous materials. *Advances in chitin science.* **3**: 24-37.
- Domard** A. and Rinaudo. 1983. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules.* **5**: 49-52.



- Droby** S., Vinokur, V. B., Weiss, L., Cohen, A., Daus, E., Goldschmidt, E., and Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*. **92**: 393-399.
- Einbu**, A., Naess, S. N., Elgsaeter, A. and Vårum, K. M. (2004). Solution properties of chitin in alkali. *Biomacromolecules*, **5**: 2048-2054.
- Einbu**, A. and Vårum, K.M. 2008. Characterization of chitin and its hidrolizates to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules*, **9**: 1870-1875.
- El Ghaouth**, A., Brown, G. E., Ippolito, A., and Wisniewski, M. (2000). Applications of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease*. **84**: 243-248.
- Felse**, P. A. and Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*. **20**: 505-512.
- Focher**, B., Beltrame, P. L., Naggi, A. and Torri, G. (1990). Alkaline N-Deacetylation of Chitin Enhanced by Flash Treatments. Reaction Kinetics and Structure Modifications. *Carbohydrate Polymers*. **12**: 405-418.
- Freepons**, D. (1997). Enhancing food production with chitosan seed-coating technology. In: Applications of Chitin and Chitosan, Goosen MFA, ed. (Lancaster, PA: Technomic Publishing) pp 129-139.
- Friedman, M.R. and Gaden, E.L. (1970). Growth and acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dialysis culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **12**:961-974.
- Gao**, X., Katsumoto, T. and Onodera, K. (1995). Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.*, **117**(2): 257-263.
- García-Carreño**, F., Hernández-Cortés, P. and Haard, N.F., (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine Decapod. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1456-1461.
- Gimeno**, M., Ramírez-Hernández, J.Y., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García- Arrazola, R., Bárzana, E. and Shirai, K., (2007). One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 10345- 10350.
- Gooday**, G. W. (1990). Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*. **170**(1):190.
- Gordon**, O.J. (2005). Digestive endo-proteases from the midgut Glands of the Indian white shrimp, *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) from Kenya J G., Western Indian Ocean. *J. Mar. Sci.*, **4** (1): 109-121.
- Hwang**, K.T., Jung, S.T., Less, G.D., Chinnan, M.S., Park, Y.S. and Park, H.J. (2002). Controlling Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan by Response Surface Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, **50** (7): 1876-1882.
- Hadwiger**, L.A., Fristensky, B. and Riggelman, R.C. (1984). Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields. In: Chitin, Chitosan, and Related Enzymes, Zikakis JP, ed. (Orlando, FL: Academic Press) pp 291-302.
- Healy**, M., Green, A. and Healy, A. (2003) Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnol.*, **23**(2-3):151-160.
- Heredia**, A., Aguilar-Franco, A., Magaña, C., Flores, C., Piña, C., Velázquez, R., Schaffer, T. E., Buio, L. and Basiuk, V. A. (2007). Structure and interactions of calcite spherulites with alfa-chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. *Materials science and Engineering*. **27**: 8-13.
- 5.4 **Hirai**, A., Odani, H. and Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*. **26**: 87-94.
- Hirano**, S., Yamamoto, T., Hayashi, M., Nishida, T. and Inui, H. (1990). Chitinase activity in seeds coated with chitosan derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 2719-2720.
- Hirano**, S. (1999). Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. **48**(8): 732-734.
- Johnson**, E.A. and An, G.H., (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **11**: 297-326.

- Jung**, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, K.Y. and Park, R.D. (2006). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**:234–237.
- Jung**, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, K.Y., Oh, K.T. and Park, R.D. (2007). Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Carbohydr. Polym.*, **68**:746–750.
- Kafetzopoulos**, D., Thireos, G., Voumakis, J. N. and Bouriotis, V. (1993). The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(17): 8005-8008.
- Kumar**, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*. **46**:1-27.
- Kurita**, K., Sannan, T. and Iwakura, Y., (1977). Preparation of pure chitin, poly(N-acetyl-D-Glucosamine), from the water-soluble chitin. *Macromolecules Chemistry*. **178**: 2595-2602.
- Kurita**, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean. *Marine Biotechnology mini-review*. **8**:203-226.
- Lang**, T. M., and Chen, R. H., (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. **88**: 2917-2923.
- Lamarque**, G., Viton, C. and Domard, A. (2004). Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ - chitins in a multistep process. *Biomacromolecules*. **5**: 1899-1907.
- Lamarque**, G., Viton, C.M. and Domard, A. (2005). New Route of Deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chitins by Means of Freeze–Pump Out–Thaw Cycles. *Biomacromolecules*. **6**: 1380–1388.
- Lim**, S. and Hudson, S. (2003). Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol. Sci. Rev.*, **43**: 223–269.
- Lima**, S., Arru, G., de Curtis, F. and Arras, G. (1999). Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial and Biotechnology*. **23**:223-229.
- Lindgren**, S.V. and Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*. 87(1-2) :149-163.
- Liu**, X. and Osawa, T., (2007). Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **357**: 187–193.
- Mazeau**, K., Winter, W.T. and Chanzy, H. (1994) Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. *Macromolecules*, **27**, 7606-7612.
- Martinou**, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. (1995). Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Research*. **273**(2): 235-242.
- Matthews**, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P. and Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microb.*, 70(10): 5715–5731.
- Minke** R. and Blackwell, j. (1978). Structure of Alpha-Chitin. *Journal of Molecular Biology*. **120**(2): 167-181.
- Miya**, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S., (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *J. Appl. Polymer Sci*. **28**: 1909–1917.
- Minami**, S., Raj, K.D., Miyatake, K., Okamoto, Y., Ohta, H., Sasai, S. and Shigemasa, Y. (2001). Biological effect of chitosan-lactose mixture and its clinical applications. *Chitin chitosan Res.*, **7**: 268-272.
- Minoru**, M., Hiroyuki, S. and Yoshihiro, S. (2002). Control of functions of chitin and chitosan by chemical modifications. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **14**(78): 205 – 222.

- Mortensen**, A. and Skibsted, L.H., (2000). Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 279–286.
- Nahar**, P., Ghormade, V. and Deshpande, M.V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85(2):80-88.
- Nagyvary**, J.J., Falk, J.D., Hill, M.L., Schmidt, M.L., Wilkins, A.K., and Bradbury, E.L. (1979). The hypolipidemic activity of chitosan and others polysaccharides in rats. *Nutr. Rep. Int.* 20:677-684.
- Nemtsev**, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M. and Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **38**(6):521-526.
- Nishimura**, S. (2001). Chemical biology and biomedicine: general aspects, In: Glycosciences: Chemistry and chemical Biology, Fraser-Reid BO, Tastuta K, Thiem J, eds. New York: Springer Chapter 6.
- Oh**, E., Kim, D., Kim, J. and Kim, H., (2000). Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaeus orientalis*. *J. Food Biochem.* **24**: 251–264.
- Okuyama**, K., Noguchi, K., Kanenari, M., Egawa, T., Osawa, K. and Ogawa, K. (2000) Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*, **41**, 237-247.
- Ortiz López Adela Irmene**, Tesis doctoral 2004
- Pacheco**, N., Garnica-González, M., Ramírez-Hernández, J. Y., Flores-Albino, B., Gimeno, Miquel., Bárzana, E., and Shirai, K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource technology*. **100**, 2849-2854.
- Pastor**, A. (2004). Generalidades de Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones, En Pastor, A. (ed) Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo editorial, pp. 25-71.
- Percot**, A., Viton, C. and Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*. **4**:12–18.
- Pillai**, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers : chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in polymer science*. **34**:641-678.
- Piantanelli**, L. (1986). A mathematical model of survival kinetics. I. *Theoretical basis. Archives of Gerontology and Geriatrics* 5: 107-118.
- Plascencia-Jatomea**, M., Olvera-Novoa, M.A., Arredondo-Figueroa, J.L., Hall, G.M. and Shirai, K. (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *J. Sci. Food Agric.* **82**: 753–759.
- Plascencia**, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo, M. and Shirai, K. (2003). Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.*, **3**:582–586.
- Prashanth**, K. V. H., and Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends in food sciences and technology* (18):117-131.
- Rangel-Mendez**, J.R., Monroy-Zepeda, R., Leyva-Ramos, E., Díaz-Flores, P.E. and Shirai, K., (2009). Chitosan selectivity for removing cadmium (ii), copper (ii), and lead (ii) from aqueous phase: pH and organic matter effect. *J. Hazard. Mater.*, **162**: 503– 511.
- Rao**, M.S., Muñoz, J. and Stevens, W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **54**: 808–813.
- Rao**, M. S. and Stevens, W. F. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**: 1080-1087.
- Raabe**, D., Sachs, C. and Romano, P. (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia*. **53**: 4281-4292.
- Rabea**, E. I., Badawy M, E.-T., Stevens c, V., Smagghe G., and Steurbaut, W., (2003) Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of Action, *Biomacromolecules*. **4**(6):1457-1465.

- Ramirez-Coutiño**, L., Marin-Cevantes, M. del C., Huerta, S., Revah, S., and Shirai, K., (2006), Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. **41**:1106-1110.
- Ramirez-Coutiño (tesis doctoral 2008)**
- Ratkowsky**, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* **154**: 1222–1226.
- Raymond, Mc G.**, (1994). Application of *Candida guilliermonii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Biological Control* **4**:1-7 .
- Reddy, S.G., Henrickson, R. L. and Olson, H. C. (2008). the influence of lactic cultures on ground beef quality. *Journal of Food Science*. **35** (6): 787 – 791.
- Rinaudo**, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, **31**: 603-632.
- Roberts GAF** (1992a) Chitin Chemistry. (London: Macmillan).
- Rudrapatnan**, N., Tharanathan and Farooqahmed, S. K. (2003). Chitin- The undisputed Biomolecule of great potential. *Critical reviews in food science and nutrition*. **43**(1):61-87.
- Rutherford**, FA. and Austin, PR., (1978). Marine chitin properties and solvents. In: Proceedings of the first Int. Conference on chitin /chitosan. Muzzarelli RAA., Pariser ER, eds. pp 182-192.
- Sachindra**, N. M., Bhaskar, N., Siddegowda, G. S., Sathisha, A. D. and Suresh, P. V. (2007). Recovery of carotenoides from ensilage shrimp waste. *Bioresource technology*. **98**: 1642-1646.
- Sagoo**, S. K., Board, R. and Roller, S. (2002). Titulo del articulo. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**: 168–172.
- Sannan**, T., Kurita, K., Ogura, K. and Iwakura, Y. (1978). Studies on chitin. 7. I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer*. **19**: 458–459.
- Sahu**, A., Goswami, P., and Bora, U., (2008). Microwave mediated rapid synthesis of chitosan. *J. Mater. Sci.* numero y paginas
- Shahidi**, F., Arachchi, J. K. V., and Jeon Y. (1999). Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science & Technology* .**10**: 37–51.
- Shahidi**, F. and Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products:chemistry production applications and health effects. *Advances in food and nutrition research*. **49**: 93-135.
- Shirai**, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzalez, R.O. and Hall, G.M., (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microb. Tech.*, **28**: 446–452.
- Shrestha**, B., Blondeaub, K., Stevensa, W.F. and Hegaratb, F.L. (2004). Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*. **38**(2): 196-204.
- Sini**, T.K., Santhosh, S. and Mathes, P.T. (2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research*. **342**: 2423-2429.
- Simon**, L. y Karim, M. N. (2001). Probabilistic neural networks using Bayesian decision strategies and a modified Gompertz model for growth phase classification in the batch culture of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Eng. J.* **7**: 41-48.
- Sorlier**, P., Denuzière, A., Viton, C., and Domard, A., (2001). Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*. **2**: 765-772.
- Stawski**, D., Rabiej, S., Herczynska, L. and Draczynski, Z. (2008). Thermogravimetric analysis of chitins of different origen. *Journal of thermal analysis and calorimetry*. **2**: 489-494.
- Synowiecki**, J. and Al-Khateeb, N.A., (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.*, **43**: 145–171.
- Tamura**, H., Hamaguchi, T. and Tokura S., (2004). Destruction of rigid crystalline structure to prepare chitin solution. In: Advances in chitin science, Vol. 7, Boucher I, Jamieson, K. Retnakaran, A, Eds (Montreal: 9<sup>th</sup> ICCG) pp 84-87
- Terbojevich**, M., Carraro, C., Cosani, A. (1988). Solution studies of the chitin-lithium chloride-N-dimethylacetamida system. *Carbohydrate Research*. **180**: 73-86.

- Tsai**, G-J., Su, W-H., Chen, H-C and Pan, C-L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*. **68**: 170-177.
- Tsigos**, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., and Bouriotis, V., (2000). Chitin deacetylases: new versatile tools in biotechnology, *Tibtech*. **18**: 305-312.
- Uchida** Y, Izume M, Ohtakara A (1989) Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In: Chitin and Chitosan, Skjak-Bræk G, Anthonsen T, Sandford P, eds. (Essex: Elsevier) pp 373–382
- Wang**, S-L., Yef. Y-H., Tzeng, G-C. and Hsielf, C. (2005). Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin waste fermented by *Pseudomonas florecens* K-188. *Enzyme and Microbial Technology*. **36**: 49-56
- Walton**, A., and Blackwell, J., Biopolymers, Academic press, New York 1973
- Win**, N.N. and Stevens, W.F. (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **57**: 334-341.
- Xu**, Y., Gallert, C. and Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deprotonation and decalcification. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **79**: 687-697.
- Yang**, J-K., SHih, I-L., Tzeng, Y-M. and Wang, S-L. (2000). Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. **26**: 406-413.
- Young-Ju**, K., Zhao, Y., Oh K-T., Nguyen, V-N. and Park, R-D. (2008). Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylases from a newly screened *mortierella* sp. DY-52. *J. Microbiol. Biotechnol*. **18**(4): 759-766.
- Yuan**, J.P. and Chen, F. (1999). Isomerization of trans-astaxanthin to cis-isomers in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 3656–3660.
- Zakaria**, Z., Hall, M., Shama, G., (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochem.*, **33**: 1–6.
- Zhang**, Y., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., Fu, X., (2006). Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. *Carbohydrate Polymers*. **65**: 229-234.
- Zwietering**, M.H., De Wit, J.V., Cuppers, H.G.A.M. and Van't Riet, K. (1994). Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Appl. Environ. Microb.*, **60**: 204– 213.

---

# ANEXOS

---

A1. Técnicas de preparación, caracterización y análisis de muestras y productos utilizados.

## **Preparación de Etilen glicol quitosano (EGC)**

Principio: Preparación de etilen glicol quitina acetilando el etilenglicon quitosano

Reactivos: Etilenglicol quitosano,  $\text{NaHCO}_3$ , anhídrido acético

Procedimiento

1. Mezclar 40mg de EGC a 4°C + 400mg de  $\text{NaHCO}_3$  + 4.5ml de anhídrido acético Dejar por 24h a 4°C.
2. Adicionar 200 µl de anhídrido acético dejar 24h a 4°C
3. Dializar

## **Preparación de Glicol quitina soluble en agua**

Principio: La quitina se trata con solución acuosa de hidróxido de sodio para obtener quitina alcalina (alkoxidos de sodio de quitina). La quitina alcalina reacciona con clorohidrina de etileno (2-cloroetanol) para obtener glicol [o-(2-hidroxietil)] quitina.

Reactivos procedimiento A

Quitina en polvo, hidróxido de sodio, dodecil sulfato de sodio, etilen clorohidrina (39ml por 24 equivalentes mol.mol<sup>-1</sup> N-acetil-D-glucosamina residuos), anhídrido acético, ácido acético, acetona, etanol, papel filtro de vidrio de 10 µm.

### Reactivos Procedimiento B

Hidróxido de sodio, dodecil sulfato de sodio, 2-propanol, etilen clorohidrina (16ml, 10 equivalentes mol.mol<sup>-1</sup> N-acetil-D-glucosamina residuos), ácido cloroacético (9.5g, 5 equivalentes mol.mol<sup>-1</sup> N-acetil-D-glucosamina residuos), etanol, anhídrido acético, acetona

### Procedimiento A

#### 1. Preparación de productos

- 4g de quitina en polvo suspenderla en 80ml de NaOH (42% p/p) conteniendo dodecil sulfato de sodio al 0.2%, agitar la suspensión a temperatura ambiente por 4h a presión reducida (-20mmHg) ocasionalmente vueltas.
- La quitina alcalina se colecta mediante filtración con papel filtro de vidrio de diámetro 10µm, se lava con NaOH al 42% poco, escurrido presionado y planchado hasta alcanzar peso < 14g.
- Mezclar vigorosamente la quitina con hielo molido (60g) por 30 min en baño de hielo para producir una solución viscosa.
- Diluir la solución con NaOH 28g en 112ml (14%) si se forma un gel, mezclar en temperatura menor a 0 hasta obtener una solución homogénea.
- Dejar la solución en baño de agua fría, y adicionar la etilen clorohidrina 39ml para obtener glicolquitina.
- Disolver en 70ml de NaOH al 14% en baño de hielo agregándolo gota a gota, agitando durante 30min, la mezcla se puede dejar a temperatura ambiente toda la noche.
- La solución se coloca en baño de hielo se agregan 8ml de anhídrido acético gota a gota agitando por 30min, la mezcla se neutraliza con ácido acético en frío.

#### 2. Purificación de productos

- Diálisis por 2 días, el dializado se centrifuga a 5000 rpm por 20min para remover insolubles y 3 volúmenes de acetona son agregados al sobrenadante.
- Después de dejar reposar por una noche se separa el precipitado por centrifugación 5000rpm por 20min y se lava con acetona.
- El producto es redissuelto en etanol (30ml) se colecta por filtración y se seca para obtener 3.5g de glicol quitina, se dializa y liofiliza.

### Procedimiento B

- Quitina en polvo 4g se mezcla con NaOH al 60% (16ml) conteniendo 0.2% de dodecilsulfato de sodio a 4°C por una hora y la mezcla se mantiene a -20°C por toda la noche.
- La quitina alcalina congela se adiciona en porciones a 70ml de 2-propanol que contiene 16ml de etilen clorohidrina en un baño de hielo por 30min, la mezcla se agita por una hora a temperatura ambiente.

- c. El producto se colecta filtrando con papel filtro de vidrio y es lavado perfectamente con etanol para obtener un polvo.
- d. El polvo se disuelve en agua 300ml agitando a temperatura ambiente para obtener una solución viscosa, el producto es N-acetilado con anhídrido acético y purificado como en el procedimiento A.

Descrito por: Shigehiro Hirano in *Methods in enzymology*, vol 161 1988

### **Extracción química de la quitina**

Principio: Eliminar minerales y proteínas ligadas a la quitina a partir de ácidos y bases concentradas.

Reactivos: HCl 1M, NaOH 1M

Preparación:

Desmineralización:

1. Vaciar 40ml de HCl por 1g de quitina en un Matraz erlenmeyer, agitar mediante el uso de una parrilla de agitación por 30min hasta observar la completa ausencia de burbujas en el medio ocasionadas por el carbonato de calcio que es convertido a CO<sub>2</sub> durante la reacción.
2. Neutralizar con agua, lavar, centrifugar y liofilizar.

Desproteínización:

1. Vaciar 20ml de NaOH por 1g de quitina en un matraz erlenmeyer, colocar en parilla de agitación y dejar reaccionar por 24h a 70°C.
2. Parar la reacción al enfriar en agua helada y neutralizar con la adición de HCl, lavar, centrifugar y liofilizar.

Descrito por Percot *et al.*, 2003

### **Desacetilación química de la quitina por el método de Heterogéneo de Freeze – Pump Out – Thaw cycles FTP**

Principio: Hacer reaccionar el grupo acetilo de la quitina para obtener quitosano

Reactivos: Solución de NaOH 50% (w/v)

Preparación de muestras:

3. Vaciar 22.2ml de solución de NaOH por 1g de quitina y en un reactor schlench a 25°C, cerrar el reactor y congelar con nitrógeno líquido.
4. Después de congelar el medio de reacción, desgasificar mediante el uso de una bomba de vacío, descongelar posteriormente a 25°C y recongelar nuevamente con la ayuda de nitrógeno líquido, repetir el ciclo de 6 a 7 veces para asegurar la ausencia de oxígeno en el medio y permitir la entrada del NaOH en la molécula.



5. Después del último ciclo, el reactor se desplaza a un baño de aceite a 100°C, la solución es agitada durante el tiempo necesario o a probar.
6. En seguida la reacción es detenida al enfriar sumergiendo el reactor en nitrógeno líquido.
7. La solución es neutralizada con 1M a 0°C hasta llegar a un pH 8.5. Es necesario hacer lavados ( 5 – 6) con agua destilada a pH 8.5 (adicionar unas gotas de amoníaco si es necesario), resuperar el biopolímero, centrifugar y liofilizar.

Desacetilación descrita por Lamarque *et al.*, 2005

### **Desacetilación química de la quitina por el método Room-Temperature-Homogeneous-Deacetylation**

Principio: Hacer reaccionar el grupo acetilo de la quitina para obtener quitosano

Reactivos: Solución de NaOH 60% (w/v)

Preparación de muestras:

1. Vaciar 1g y 15ml de solución de NaOH en un matraz erlenmeyer con tapa de rosca, agitar a temperatura ambiente por 4 días.
2. Parar la reacción al lavar la muestra con agua destilada hasta que el pH sea neutro.
3. Dejar escurrir y secar a la estufa a temperatura no mayor de 40°C.

Técnica descrita por Ramírez-Coutiño *et al.*, 2006

### **Determinación de Nitrógeno total por el método de Kjeldahl**

Principio: Combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ác. Sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco, el sulfato de amonio producido se alcaliniza y se destila para desprender el amoníaco que posteriormente es atrapado y titulado.

Reactivos para digestión: Acido sulfúrico concentrado 20ml por muestra, mezcla reactiva de selenio 4g por muestra, 3L de NaOH al 20% para atrapar vapores

Reactivos para equipo de titulación: Solución de ácido clorhídrico 0.1 ó 0.01M para titulación (Valorada), 3L de NaOH al 30% para equipo, 1L de ácido Bórico para equipo.

Procedimiento

Digestión de muestras

1. Pesado de la muestra de 0.5 a 1g dependiendo de la cantidad de nitrógeno reportada (mayor de 5% de Nitrógeno 0.5g menor 1g), si es sólido pesar en papel cera y registrar el peso, si es líquido se pesa directamente en el tubo de digestión y se registra el peso exacto.

2. Adicionar 4g de mezcla reactiva de selenio a cada tubo.
3. En la campana de extracción adicionar 20ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo, cuidando de no derramar ácido en los soportes.
4. Colocar la base con los tubos en el digestor (figura 1), colocar la tapa de los tubos cuidando que selle perfectamente, si es necesario colocar cinta en la unión de los tubos con la tapa para asegurar el sellado, conectar las mangueras provenientes de la unidad de aspiración neutralización al digestor.
5. Una vez conectado encender la unidad de aspiración y posteriormente el botón verde del digestor, con las perillas ir aumentando la intensidad de calor progresivamente de 2 a 3 unidades cada 5 minutos hasta llegar a 10. Dejar digerir y verificar el cambio de color de las muestras.
6. Una vez que se obtiene un color verde botella cristalina, apagar el digestor y colocar las muestras para enfriamiento. No apagar la unidad de aspiración hasta que dejen de salir vapores de las muestras.
7. Después de que las muestras estén frías son llevadas a titulación.

### Titulación de muestras

Antes de prender el equipo es importante verificar que cuente con más del 70% de soluciones en los botes que están a su lado derecho (Agua, NaOH y ác. Bórico).

Calibración y preparación del equipo, **muy importante prender el agua que enfría el equipo antes de prenderlo**. Prender equipo de titulación en la parte posterior, cambiar solución de ácido clorhídrico valorado en el interior del equipo.

1. Colocar un tubo con 50ml de agua destilada en el equipo de titulación para precalentamiento y priming. En el software: Entrar al menú principal Main menu → Determination → Preheating, (main menu) → Determination → Priming → Ac. Bórico.
2. Una vez realizado el precalentamiento es necesario instalar y purgar la bureta Main menu → System function → Burette function → Install Burette.
3. Instalar la bureta 2 veces y posteriormente el mismo procedimiento pero al final se oprime purgar bureta 2 o 3 veces.
4. Una vez preparado el equipo se coloca el electrodo en el vaso y si es necesario se calibra. Main menu → pH calibration (colocar las soluciones valoradas que pide el equipo).
5. Se registra el valor de molaridad del ácido clorhídrico de la siguiente manera: Main menu → Determination → Boric acid titration → Cuando aparecen los datos y las condiciones del equipo se cambia el valor de molaridad del ácido.
6. Ya calibrado el equipo se colocan los valores de pesos registrados de las muestras Main menu → sample weight (gr) → se coloca el nombre de la muestra, el peso en gramos y el factor de proteína a utilizar.

### Titulación de muestras

1. La primera muestra que se coloca es la del blanco la cual lleva lo mismo que todas las muestras solo que sin muestra (papel cera + mezcla reactiva + ácido sulfúrico + digestión). Main menu → Determination → Boric acid titration → (iniciar con el blanco).

2. Posteriormente realizar todas las muestras siguientes.

Una vez terminado apagar el agua, limpiar el equipo y dejar todo en orden.

Los valores que aparecen en la impresión equivalen a:

A= % de nitrógeno

B= % de proteína

Equipo de titulación

Importante: Para titular prender el agua, checar que nunca se quede sin soluciones el equipo de titulación, checar que la unidad de aspiración y neutralización este lo suficientemente nueva para neutralizar los vapores (solución de NaOH 30%).

### **Determinación de actividad proteolítica**

Principio: Determinación de hidrólisis del sustrato por los extractos a analizar, mediante la variación de la absorbancia con respecto a un testigo.

Reactivos: Caseína, Buffer de fosfatos 50 mM pH= 6.5 ó 7, ácido tricloroacético TCA al 5% (p/v).

Preparación de soluciones:

Solución de caseína al 1% en Buffer de fosfatos, tomar 1g de caseína en 50ml de Buffer de fosfatos, calentar a ebullición en baño María por 20 minutos, ajustar pH y aforar a 100ml con el Buffer.

Técnica:

1. 500µl de caseína 1% (p/v) en Buffer de fosfatos 50mM, si esta frío atemperar por 10min a 30°C.
2. Adicionar 75 µl de extracto enzimático.
3. Incubar a 30°C por 1h sin agitación.
4. Adicionar 1ml de TCA al 5% para parar la reacción.
5. Centrifugar a 12000rpm x 7min.
6. Leer a 280nm en celdas de cuarzo

\*El blanco se prepara con agua en lugar de extracto siguiendo todo el procedimiento

\*El testigo lleva el extracto pero no se incuba

\*Para las absorbancias se observan primero los testigos y luego su muestra respectiva.

Una unidad de actividad [E] se define como la cantidad de [E] que aumenta 0.001 unidades de Abs/min la solución anterior con respecto a su testigo correspondiente.

$$\text{Unidad de actividad} = \frac{\text{Muestra} - \text{Testigo}}{(60\text{min})(V\text{de Extracto ml})(0.001)}$$

### **Actividad desacetilasa**

Principio: La etilen glicol quitina funciona como sustrato para las enzimas desacetilasas, liberando acetato que se determina indirectamente por color desarrollado por la glucosamina producida.

Reacción enzimática:

1. Mezclar 100  $\mu$ l de Buffer tetraborato de sodio/HCL 50mM pH 8.5 + 100  $\mu$ l de 1mg/ml de EGC + 50  $\mu$ l de enzima e Incubar 30 min a 37°C.
2. Detener reacción con 250  $\mu$ l 5% (p/v)  $\text{KHSO}_4$

Para desarrollar color:

1. Adicionar 250  $\mu$ l de 5% (p/v)  $\text{NaNO}_2$  dejar 15min+ 250  $\mu$ l 12.5% (p/v)  $\text{N}_2\text{H}_6\text{SO}_3$  5min + 250  $\mu$ l 0.5% (p/v) MBTH preparado en fresco.
2. Calentar en ebullición 3min.
3. Enfriar con agua helada.
4. Adicionar 250 $\mu$ ml 0.5% (p/v)  $\text{FeCl}_3$ .
5. Dejar reposar en frio por al menos 1 hora máximo 1 día.
6. Leer a 650nm

El blanco se prepara con 50  $\mu$ l de agua en lugar de enzima o extracto enzimático y lleva el mismo procedimiento que el de las muestras.

Es necesario leer un testigo de cada muestra analizada, el cual se preparará exactamente igual a las muestras solo que no se incuba y la reacción se detiene inmediatamente, la lectura de éste se descontará de la lectura de la muestra analizada, para obtener la cantidad real de glucosamina producida durante la reacción.

La curva patrón se determina con concentración de glucosamina que indica de manera indirecta la concentración de acetato liberada.

Una unidad de enzima se considera como lo que libera 1  $\mu$ mol de acetato del EGC por min, (Pallavi *et al.*, 2004).

### **Determinación del peso molecular de quitinas mediante viscosidad intrínseca**

Preparación de disolvente:

N-N Dimetilacetamida (DMAc), cloruro de litio 5% (1L de N-N Dimetilacetamida + 50g de cloruro de litio). Secar el cloruro de litio al vacio pr 30min adicional a la dimetilacetamida y agitar durante la noche. Cerrar muy bien la botella para evitar que entre agua dentro de la solución ya que impediría que la quitina se solubilice.

Preparación de muestras:

1. Preparar una solución concentrada de 0.20mg de quitina y agitar a 40°C por 6 h o hasta que la quitina este completamente soluble por ml y preparar diluciones, (Es importante tener la quitina sin minerales para facilitar la solubilización).
2. Filtrar a través de filtros de nitrocelulosa de 5micras.

Determinación de los valores:

Las determinaciones se realizaron mediante el uso de un viscosímetro capilar automático, TI 1 SEMATech de 0.8mm de diámetro a 25°C. Los parámetros utilizados en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada fueron:  $a = 0.69$  et  $k = 2.4 \times 10^{-4} \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1}$ . (Figura A1)

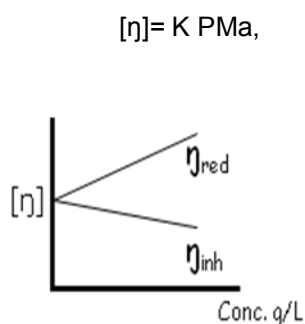


Figura A1.1|. Gráfica de las viscosidades obtenidas a partir de viscosidad intrínseca y concentración de la muestra a analizar.

$$[\eta] = (\eta_{sp}/\text{conc})_{c=0} = (\ln \eta_r/\text{conc})_{c=0}$$

### **Determinación del peso molecular de quitosanos mediante cromatografía de permeación en gel (GPC)**

Preparación del disolvente:

Solución buffer pH = 4.5, ácido acético (0.2M) y acetato de amonio (0.15M).

Preparación de muestras:

1. Preparación de una solución concentrada de quitosano en buffer al 1%, filtrar soluciones mediante membranas de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ .
2. La fase móvil a utilizar es la solución buffer previamente filtrada, inyectar muestras en el cromatografía de exclusión molecular. El equipo utilizado fue una bomba IsoChrom LC, conectada a una columna de cristal de proteína 200SW empacada con gel TSK 6000PW, acoplada a un refractómetro diferencial (Waters 410).

Para la determinación del valor de peso molecular se utilizan los valores del incremento del índice de refracción  $dn/dc$  para el quitosano que van de 0.19 a 0.183  $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  de acuerdo al DA del quitosano.

### **Determinación del grado de acetilación de quitina y quitosanos mediante resonancia magnética nuclear (RMN<sup>1</sup>H)**

Preparación de disolventes:

Para quitina: DCl/D<sub>2</sub>O 20% (p/p), es posible utilizar soluciones al 37% que mejoran la resolución de los picos (soluciones que se compran ya lista para usar).

Para quitosano: D<sub>2</sub>O (p/p) + 5ml de HCl concentrado para completa disolución de La muestra.

Técnica

1. Preparar soluciones con concentración de 20mg de quitina por ml de disolvente y 10mg de quitosano por ml de disolvente.
2. Preparación de muestras:
  - a. Para la quitina dejar en agitación por 4h en baño maría a temperatura entre 60 y 70°C durante 3 a 4 horas, hasta obtener una solución clara y homogénea.Importante: verificar que la solución este bien clara para observar correctamente los picos en los espectros, importante no aumentar la temperatura para no evaporar la solución y mantener bien cerrado para evitar pérdidas.
- b. Para el quitosano se le agrega a la solución 5μL de HCl concentrado para la completa solubilización del biopolímero dejar solubilizando durante toda la noche o al menos 12h.
3. Vaciar las muestras en los tubos de resonancia utilizando una pipeta pasteur.

Determinación de los valores de DA

Después de analizar las muestras en el equipo de resonancia magnética, en este caso un espectrómetro Bruker AC 200 protón de 200MHz a 25 °C y al menos 120 escaneos, se analizan los espectros.

Para el caso de la quitina el pico del disolvente sale al mismo tiempo que el del cloroformo, para el quitosano el valor es el del agua deuterada. Para estar seguros del iniciar en el valor de cero adecuado se utiliza TMS como referencia para ajustar a 0. El Da se calcula de acuerdo a Hirai *et al.*, 1991 con la relación del grupo metilo del proton (1-4) 2 acetamido-2-dioxi-b-D-glucano (a) y la referencia de los protones del H-2 al H-6 (b) (Figura A1.2).

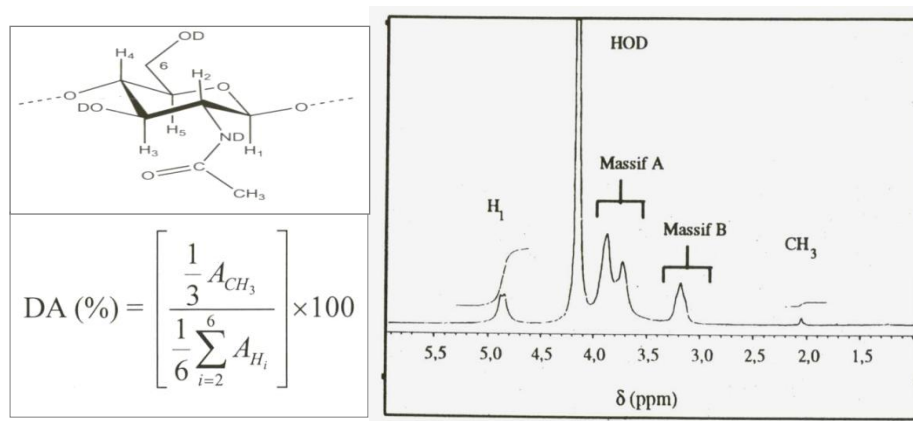


Figura A1.2 Referencia de los picos de quitosano obtenidos mediante resonancia magnética nuclear protón y su análisis

### Purificación del quitosano

Etapas : Solubilización, filtración, precipitación, centrifugación, lavados, congelación y liofilización.

1. Solubilización: Después de caracterizar el quitosano y conocer valores de DA, solubilizar el quitosano con la cantidad de ácido acético necesario para protonar los grupos aminos libres determinada por el peso molecular y el DA, pesar el quitosano y adicionar el agua y el ácido acético al menos dos litros de agua por 10g de quitosano, dejar agitar por toda la noche. Es posible adicionar un exceso del 5% de ácido acético para asegurar solubilización.
2. Filtración: a través de filtros de celulosa de 3 µm, 0.8 µm, 0.45 µm.
3. Precipitación, centrifugación y lavado: Precipitar en medio alcalino (amoníaco) adicionar unas gotas hasta observar el precipitado completo a pH entre 8 y 9, lavar con agua a pH 8, centrifugar y lavar para eliminar restos de ácido y amoníaco, repetir la centrifugación y el lavado al menos 4 veces.
4. Congelación y liofilización: después de la última centrifugación congelar y liofilizar.

#### A1.b. Explicación del uso del modelo de Gompertz

El modelo sigmoideal Gompertz es utilizado en biología, botánica, zoología y ecología para describir el crecimiento de plantas, árboles, microorganismos, animales y seres humanos cuyo comportamiento se caracteriza por curvas en forma en "S", es decir, que incrementan su tasa de cambio monótonamente a partir de un punto fijo hasta alcanzar un punto de inflexión después del cual la tasa de cambio decrece

hasta aproximarse asintóticamente a un valor final. Otra característica es que no son simétricas con respecto a su punto de inflexión (Ratkowsky, 1983).

El modelo Gompertz está dado por la siguiente ecuación:

$$y(t) = ae^{-b^{-kt}} \quad \text{Ec. A2.1}$$

Donde,  $y(t)$  y  $t$  son las variables y  $a$ ,  $b$  y  $k$  son los parámetros del modelo. Derivando la Ecuación A2.1 se obtiene la tasa de cambio de la variable  $y$ .

$$\frac{dy}{dt} = k \cdot y \cdot b \cdot e^{kt} \quad \text{Ec. A2.2}$$

El término  $-b^{-kt}$  puede escribirse en términos de “y” mediante la siguiente igualdad:

$$-b^{-kt} = \log_e \left( \frac{a}{y} \right) \quad \text{Ec. A2.3}$$

Por lo tanto la Ecuación A2.2 puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dy}{dt} = k \cdot y \cdot \log_e \left( \frac{a}{y} \right) \quad \text{Ec. A2.4}$$

La segunda derivada de la Ecuación A2.2 permite identificar la velocidad de cambio de la tasa de cambio de y:

$$\frac{d^2 y}{dt^2} = k \cdot a \cdot e^{(-b \cdot e^{-kt})} \cdot (b \cdot e^{-kt})^2 - k \cdot a \cdot e^{(-b \cdot e^{-kt})} \cdot b \cdot e^{-kt} \quad \text{Ec. A2.5}$$

La Ecuación 1.5 se puede escribir en términos de la siguiente manera:

$$\frac{d^2 y}{dt^2} = k \cdot \left( \log_e \frac{a}{y} - 1 \right) \frac{dy}{dt} \quad \text{Ec. A2.6}$$

En el punto de inflexión de la curva dy/dt es máxima y la Ecuación A2.6 es cero, por tanto:

$$\log_e \left( \frac{a}{y} \right) = 1 \Rightarrow y = a/e \quad \text{Ec. A2.7}$$

La tasa máxima se obtiene evaluando la Ecuación A2.4 para  $y = a/e$ .

$$V_{\max} = \left. \frac{dy}{dt} \right|_{y=a/e} = k \left( \frac{a}{e} \right) \log_e \left( \frac{a}{a/e} \right) = k \frac{a}{e} = 0.368 \cdot a \cdot k \quad \text{Ec. A2.8}$$

Si  $t_c$  es el tiempo al que se alcanza el punto de inflexión y la tasa máxima de consumo (producción) entonces, el punto de inflexión tiene las coordenadas ( $t_c$ ,  $a/e$ ). La siguiente relación de los parámetros b y k permite calcular  $t_c$

$$t_c = \frac{(\ln b)}{k} \quad \text{Ec. A2.9}$$

Al ser un modelo empírico, el modelo no considera la reducción en la tasa por la reducción de la concentración de sustrato. En este sentido es considerado como una relación de orden cero. Además, el valor de K (h-1) es independiente de la cantidad de muestra utilizada. El ajuste de datos experimentales de consumo de sustratos o producción de metabolitos con éste modelo reduce el error al tratar de ajustar con una línea. A pesar de que el modelo Gompertz no tiene un enfoque



fenomenológico, es posible asociar los valores de las constantes a tasas de consumo observadas experimentalmente (Ortiz López 2004).

En este trabajo, el modelo Gompertz es utilizado como una herramienta matemática para ajustar los datos experimentales de la producción de producción de ácido láctico y acetato, a fin de obtener los parámetros  $a$  y  $k$  que permitan predecir un valor de tasas de producción o consumo máximas.

Los parámetros cinéticos obtenidos del modelo Gompertz se han utilizados en diversos campos como en: crecimiento demográfico, crecimiento de poblaciones, biología (Piantanelli, 1986). El modelo Gompertz

también ha sido usado para describir el crecimiento microbiano en procesos de fermentación asociando a los tres parámetros del modelo a las tres fases del crecimiento microbiano: la de aclimatación, la logarítmica y la estacionaria (Simon and Karim, 2001).

A2. Ajustes al modelo de Gompertz de los datos de acidificación ATT (mmol de ác. Láctico / g de desecho) de todas las fermentaciones a diferentes temperaturas obtenidas mediante el programa OriginPro 7.0.

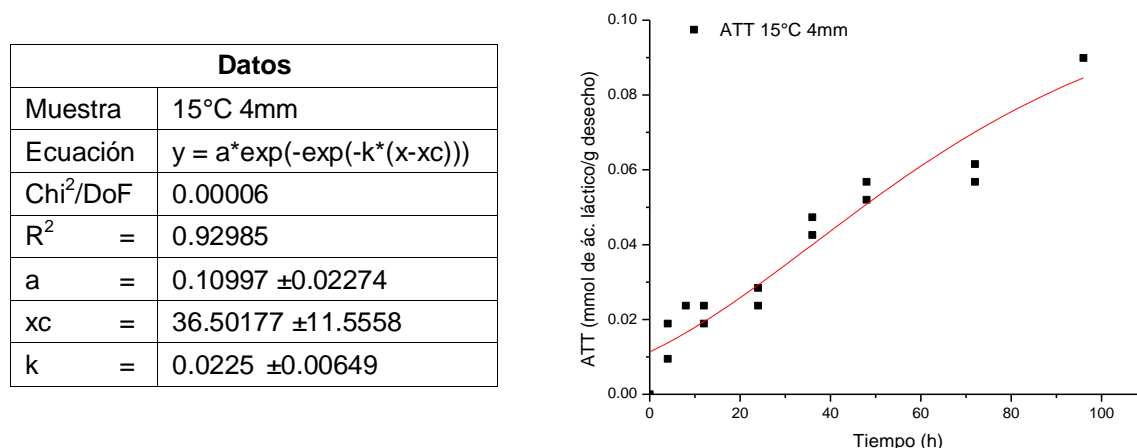


Figura A. 1 Ajustes de la ATT en fermentación a 15°C

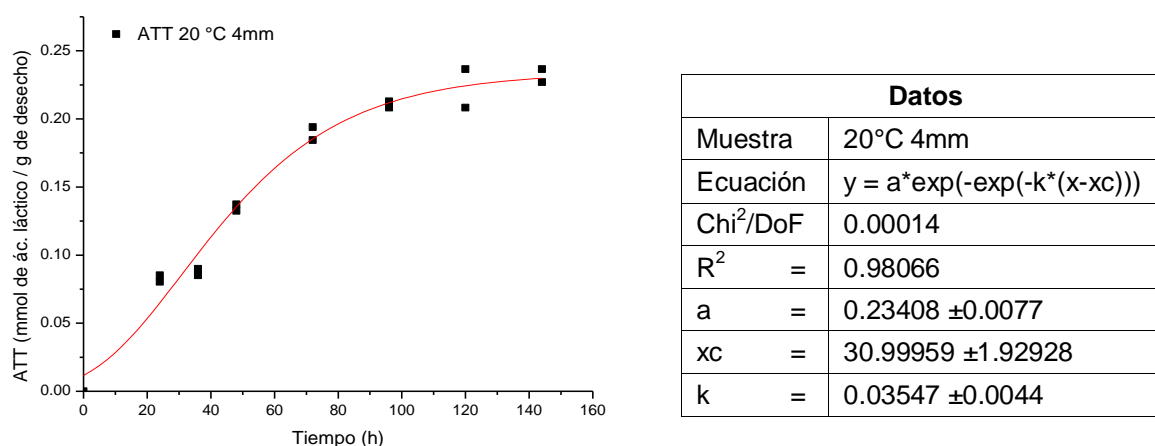
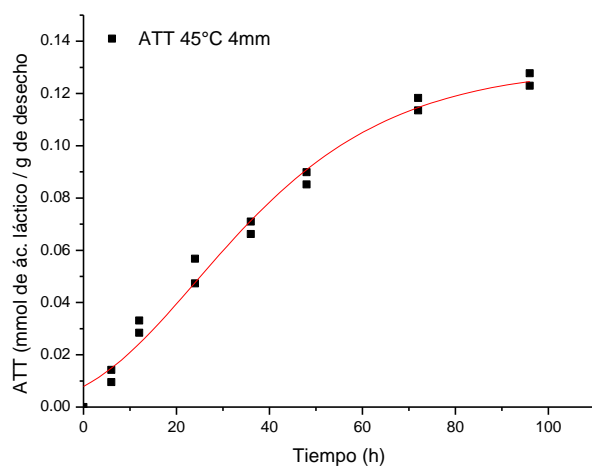


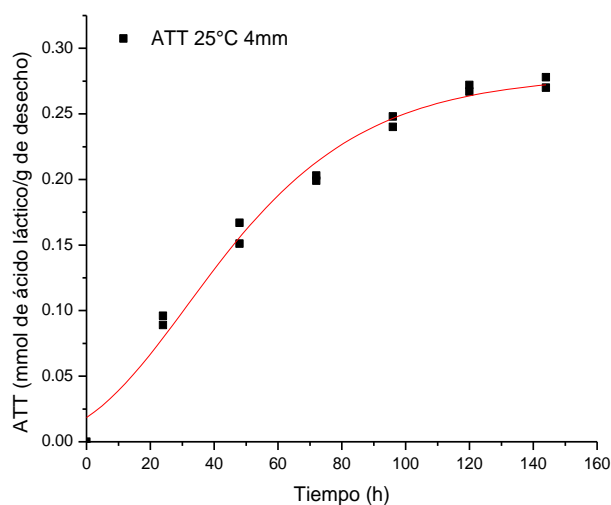
Figura A. 2 Ajustes de la ATT en fermentación a 20°C



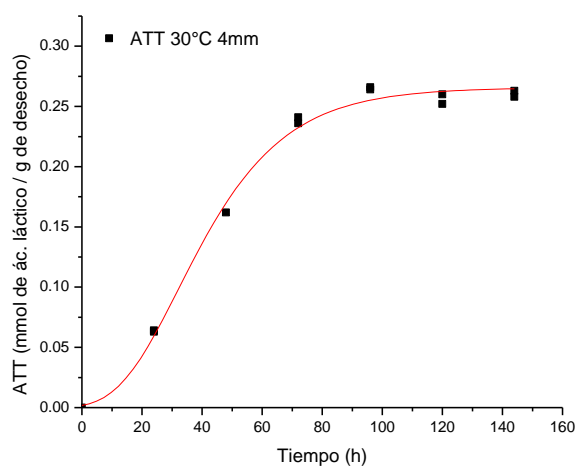
Datos	
Muestra	45°C 4mm
Ecuación	$y = a \cdot \exp(-\exp(-k \cdot (x - xc)))$
Chi <sup>2</sup> /DoF	0.00003
R <sup>2</sup>	= 0.98612
a	= 0.13064 ± 0.00514
xc	= 24.21415 ± 0.00514
k	= 0.04258 ± 0.00417

**Figura A. 3** Ajustes de la ATT en fermentación a 45 °C

Datos	
Muestra	25°C 4mm
Ecuación	$y = a \cdot \exp(-\exp(-k \cdot (x - xc)))$
Chi <sup>2</sup> /DoF	0.00015
R <sup>2</sup>	= 0.9865
a	= 0.27965 ± 0.00896
xc	= 31.23301 ± 2.18019
k	= 0.03198 ± 0.00348



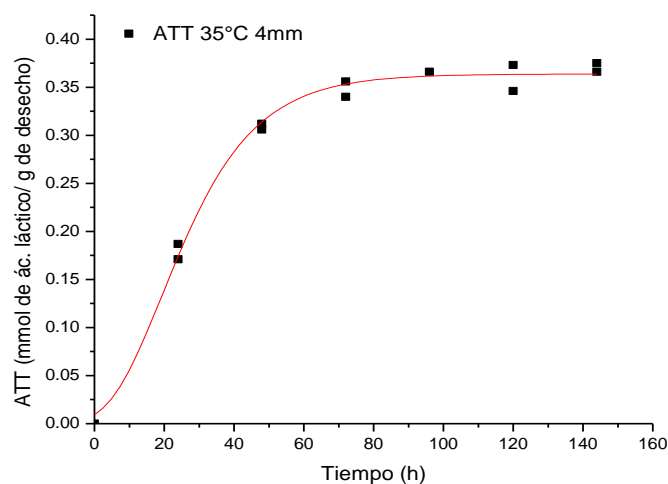
**Figura A. 4** Ajustes de la ATT en fermentación a 25 °C



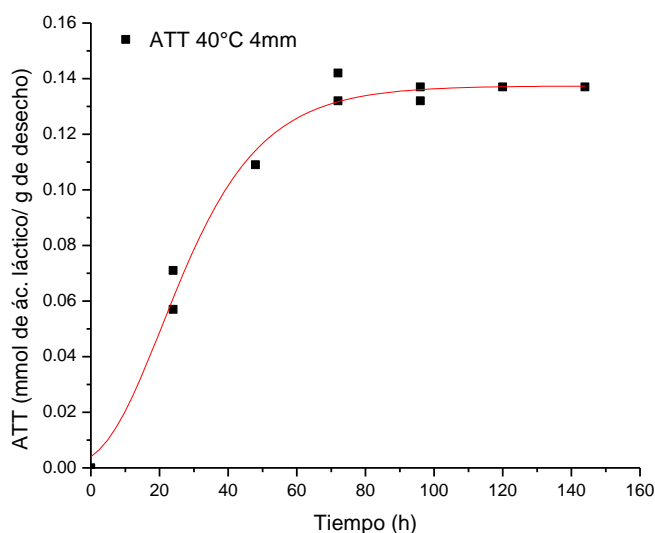
Datos	
Muestra	30 °C 4mm
Ecuación	$y = a \cdot \exp(-\exp(-k \cdot (x - xc)))$
Chi <sup>2</sup> /DoF	0.00006
R <sup>2</sup>	= 0.99562
a	= 0.26566 ± 0.00366
xc	= 31.992 ± 0.95502
k	= 0.05026 ± 0.00342

**Figura A. 5** Ajustes de la ATT en fermentación a 30 °C

Datos	
Muestra	35°C 4mm
Ecuación	$y = a \cdot \exp(-\exp(-k \cdot (x - xc)))$
Chi <sup>2</sup> /DoF	0.00011
R <sup>2</sup>	= 0.99502
a	= 0.36375 ± 0.00403
xc	= 19.40885 ± 0.89555
k	= 0.06703 ± 0.00569



**Figura A. 6** justes de la ATT en fermentación a 35 °C



Datos	
Muestra	40°C 4mm
Ecuación	$y = a \cdot \exp(-\exp(-k \cdot (x - xc)))$
Chi <sup>2</sup> /DoF	0.00003
R <sup>2</sup>	= 0.99032
a	= 0.13737 ± 0.00221
xc	= 20.5438 ± 1.26261
k	= 0.06148 ± 0.00678

**Figura A. 7** justes de la ATT en fermentación a 40 °C

A3. Análisis de varianza de los porcentajes de proteína y cenizas de muestras obtenidas después de 144h de fermentación a diferentes temperaturas.

Hipótesis:

H<sub>0</sub>:  $\mu_{T15} = \mu_{T20} = \mu_{T25} = \mu_{T30} = \mu_{T35} = \mu_{T40} = \mu_{T45}$  (las medias del contenido de proteína o ceniza son iguales para todas las temperaturas)

H<sub>a</sub>: al menos uno de las medias es distinta

#### Resultados proteína

##### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	2.3734	0.017624	Reject
Omnibus Normality of Residuals	5.6331	0.059812	Accept

## Modified-Levene Equal-Variance Test

## Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Temperatura	7	959.2635	137.0376	137.62	0.000000*	1.000000
S(A)	8	7.9662	0.995775			
Total (Adjusted)	15	967.2297				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

## Test Results

Chi-Square Method	Prob DF	(H)	Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	7	14.16177	0.048378	Reject Ho
Corrected for Ties	7	14.16177	0.048378	Reject Ho
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

## Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Proteina

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=0.995775

Group	Count	Mean	Different From Groups
35	2	7.72	25, 45, 15, 20, 0
40	2	8.91	45, 15, 20, 0
30	2	9.51	45, 15, 20, 0
25	2	11.15	35, 45, 15, 20, 0
45	2	21.01	35, 40, 30, 25, 0
15	2	21.6	35, 40, 30, 25, 0
20	2	22.21	35, 40, 30, 25, 0
0	2	30.23	35, 40, 30, 25, 45, 15, 20

## Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Proteina

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=0.995775 Critical Value=5.596223

Group	Count	Mean	Different From Groups
35	2	7.72	45, 15, 20, 0
40	2	8.91	45, 15, 20, 0
30	2	9.51	45, 15, 20, 0
25	2	11.15	45, 15, 20, 0
45	2	21.01	35, 40, 30, 25, 0
15	2	21.6	35, 40, 30, 25, 0
20	2	22.21	35, 40, 30, 25, 0
0	2	30.23	35, 40, 30, 25, 45, 15, 20

## Resultados cenizas

## Tests of Assumptions Section

Test	Prob	Decision
------	------	----------

Assumption	Value	Level	(0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-1.6938	0.090308	Accept
Omnibus Normality of Residuals	2.8689	0.238249	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test			

#### Expected Mean Squares Section

Source	DF	Term	Denominator	Expected Mean Square
Term		Fixed?	Term	
A: Temperatura	7	Yes	S(A)	S+sA
S(A)	8	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

#### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
Term						
A: Temperatura	7	269.6796	38.52566	22.63	0.000114*	0.999999
S(A)	8	13.622	1.70275			
Total (Adjusted)	15	283.3016				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: cenizas

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=1.70275

Group	Count	Mean	Different From Groups
35	2	18.21	25, 20, 40, 45, 15, 0
30	2	20.4	25, 20, 40, 45, 15, 0
25	2	25.17	35, 30, 45, 15
20	2	26.08	35, 30
40	2	26.08	35, 30, 45, 15
45	2	29.46	35, 30, 25, 40
15	2	29.94	35, 30, 25, 40
0	2	29.94	35, 30

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

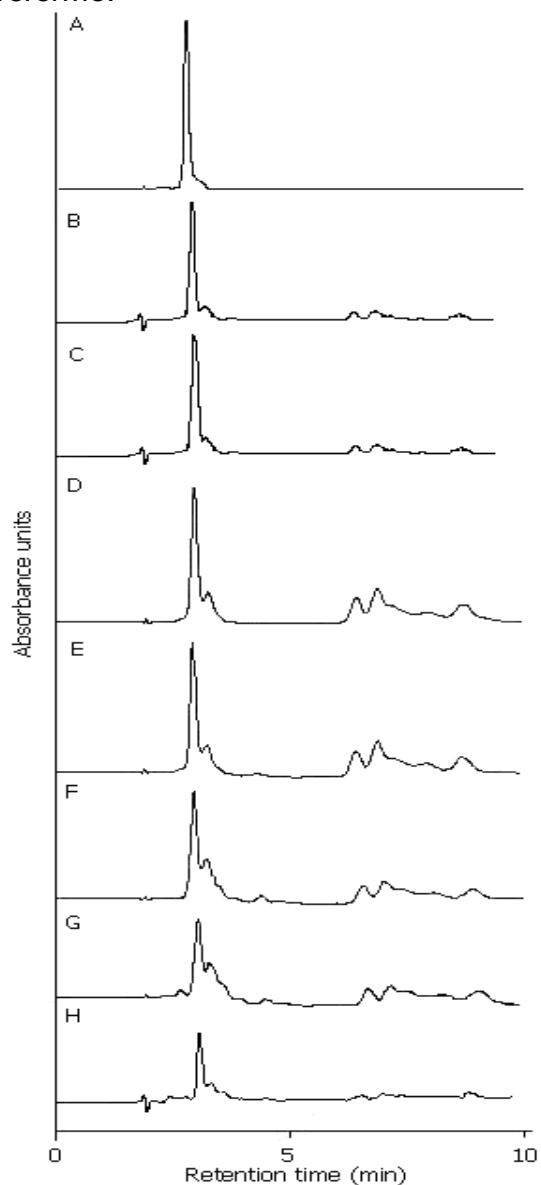
Response: cenizas

Term A: Temperatura

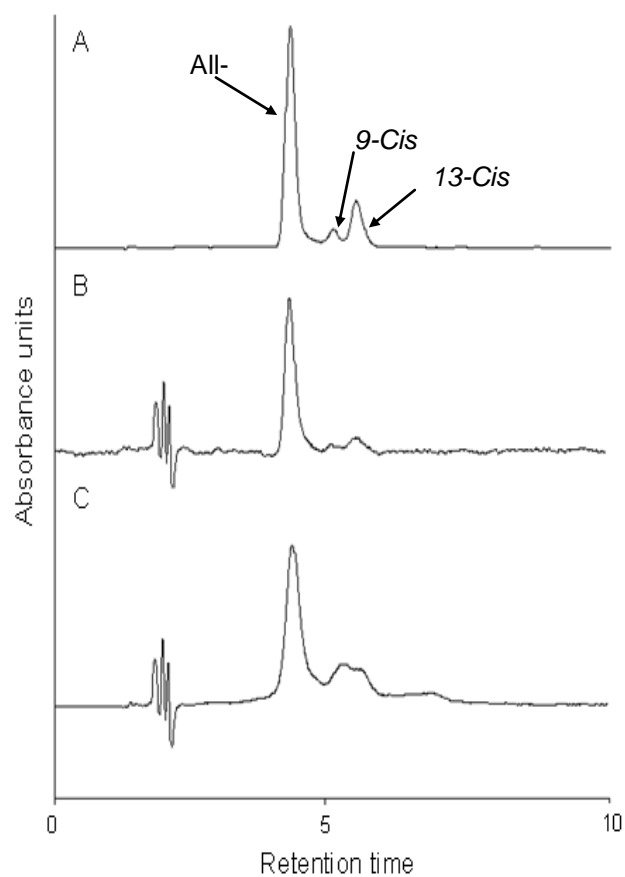
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=1.70275 Critical Value=5.596223

Group	Count	Mean	Different From Groups
35	2	18.21	25, 20, 40, 45, 15, 0
30	2	20.4	20, 40, 45, 15, 0
25	2	25.17	35
20	2	26.08	35, 30
40	2	26.08	35, 30
45	2	29.46	35, 30
15	2	29.94	35, 30
0	2	29.94	35, 30

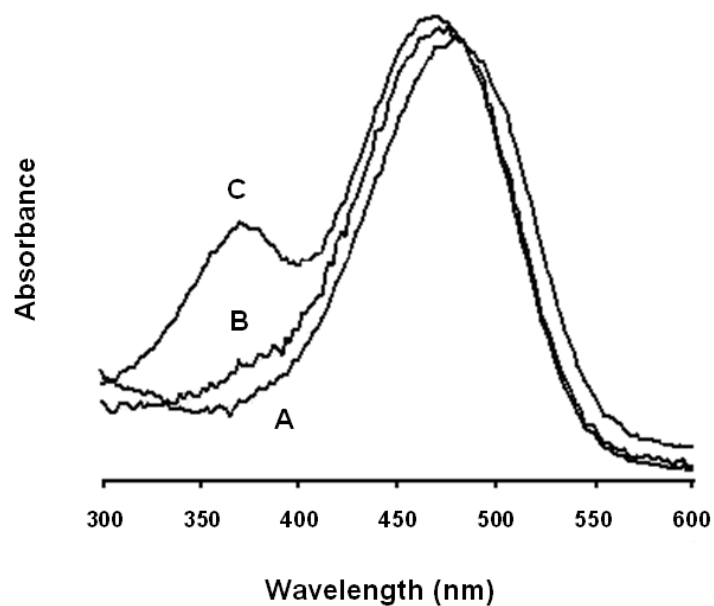
A4. Datos suplementarios, cromatogramas de HPLC de estándares de astaxantina libre y extractos de acetona a diferentes temperaturas, estándar de *trans*-astaxantina total isomerizada con cloroformo.



**Figura A. 8** cromatogramas de HPLC de a) estándares de astaxantina y B), C), D), E), F), G) y H) extractos de acetona a partir de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C y 45 °C, respectivamente.



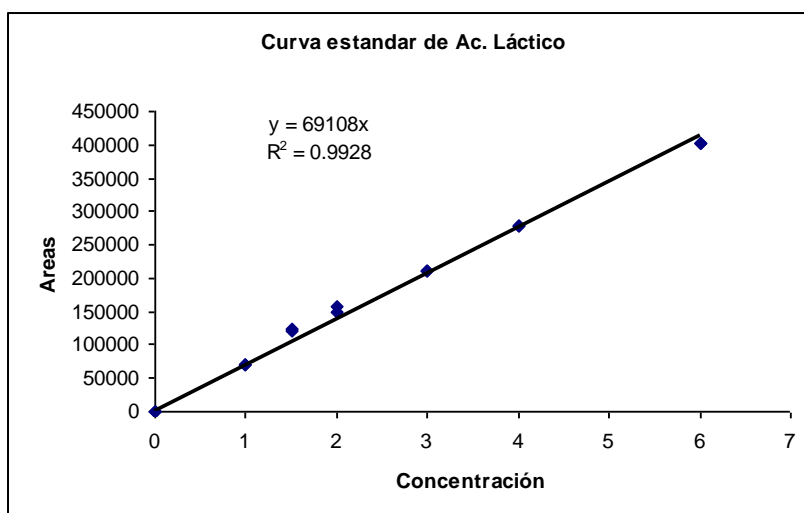
**Figura A. 9** Cromatogramas de HPLC A) estandar de *trans*-astaxantina total isomerizada con cloroformo a 37 °C por 40 h; B) extracto de fermentación 15 °C; C) extracto a 35 °C.



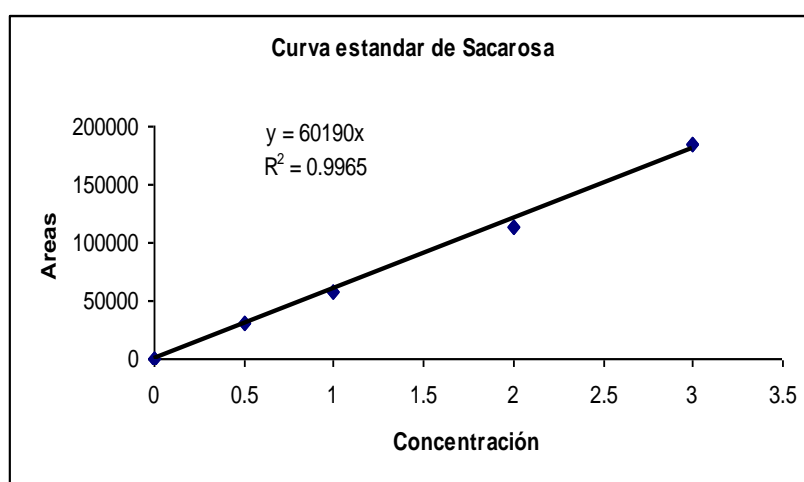
**Figura A. 10** Espectros de absorción de A) *trans*-astaxantina total, B) 9-*cis*-astaxantina y C) 13-*cis*-astaxantina en desechos de fermentación.

A4. Curvas estándares para determinar la concentración de ácido láctico y sacarosa por análisis de HPLC.

Tiempos de retención	Minutos
Acido láctico	12
Etanol	21.1
Ac. Acético	14.5
Fructosa	9.2
Glucosa	8.5
Sacarosa	7.1



**Figura A. 11** Curva estándar de ácido láctico



**Figura A. 12** Curva estándar de sacarosa



A5. Análisis de varianza de los valores de desmineralización y desproteínización de muestras obtenidas durante las 144h de fermentación.

Hipótesis:

Ho:  $\mu_{t0} = \mu_{t24} = \mu_{t48} = \mu_{t72} = \mu_{t96} = \mu_{t120} = \mu_{t144}$  (las medias de desmineralización o desproteínización son iguales para todos los tiempos).

Ha: al menos uno de las medias es distinta

### Desmineralización

#### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-2.6269	0.008617	Reject
Omnibus Normality of Residuals	6.9005	0.031738	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test			

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Temperatura	6	14887.71	2481.285	1229.62	0.000000*	1.000000
S(A)	7	14.12553	2.017933			
Total (Adjusted)	13	14901.84				
Total	14					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: D<sub>MIN</sub>

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=7 MSE=2.017933

Group	Count	Mean	Different From Groups
0	2	0	24, 48, 72, 96, 120, 144
24	2	35.15	0, 48, 72, 96, 120, 144
48	2	45.74	0, 24, 72, 96, 120, 144
72	2	63.43	0, 24, 48, 96, 120, 144
96	2	91.17	0, 24, 48, 72
120	2	91.83	0, 24, 48, 72
144	2	92.04	0, 24, 48, 72

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: D<sub>MIN</sub>

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=7 MSE=2.017933 Critical Value=5.605764

Group	Count	Mean	Different From Groups
0	2	0	24, 48, 72, 96, 120, 144
24	2	35.15	0, 48, 72, 96, 120, 144
48	2	45.74	0, 24, 72, 96, 120, 144
72	2	63.43	0, 24, 48, 96, 120, 144
96	2	91.17	0, 24, 48, 72
120	2	91.83	0, 24, 48, 72
144	2	92.04	0, 24, 48, 72

### Desproteínización

#### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
------------	------------	------------	-----------------

Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	0.7785	0.436248	Accept
Omnibus Normality of Residuals	0.6061	0.738550	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test			

#### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Temperatura	6	14041.48	2340.247	1312.66	0.000000*	1.000000
S(A)	7	12.47976	1.782823			
Total (Adjusted)	13	14053.96				
Total	14					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: D<sub>PROT</sub>

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=7 MSE=1.782823

Group	Count	Mean	Different From Groups
0	2	0	24, 48, 72, 96, 120, 144
24	2	51.97887	0, 48, 72, 96, 120, 144
48	2	68.68801	0, 24, 72, 96, 120, 144
72	2	81.61669	0, 24, 48, 96, 120, 144
96	2	92.16444	0, 24, 48, 72
120	2	94.0726	0, 24, 48, 72
144	2	94.40707	0, 24, 48, 72

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: D<sub>PROT</sub>

Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=7 MSE=1.782823 Critical Value=5.605764

Group	Count	Mean	Different From Groups
0	2	0	24, 48, 72, 96, 120, 144
24	2	51.97887	0, 48, 72, 96, 120, 144
48	2	68.68801	0, 24, 72, 96, 120, 144
72	2	81.61669	0, 24, 48, 96, 120, 144
96	2	92.16444	0, 24, 48, 72
120	2	94.0726	0, 24, 48, 72
144	2	94.40707	0, 24, 48, 72

A6. Análisis de varianza de los valores de porcentajes de proteína y cenizas de muestras obtenidas durante las 144h de fermentación.

$H_0: \mu_{t0} = \mu_{t24} = \mu_{t48} = \mu_{t72} = \mu_{t96} = \mu_{t120} = \mu_{t144} = \mu_{\text{semibiol}} = \mu_{\text{químico}} = \mu_{\text{comercail}}$   
(las medias de porcentaje de proteína o ceniza o viscosidad son iguales).

$H_a$ : al menos uno de las medias es diferente

### Proteína

#### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	0.2963	0.767012	Accept
Omnibus Normality of Residuals	0.0878	0.957057	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test			

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Temperatura	9	882.3828	98.04253	175.99	0.000000*	1.000000
S(A)	10	5.57085	0.557085			
Total (Adjusted)	19	887.9537				
Total	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Proteína, Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=10 MSE=0.557085

Group	Count	Mean	Different From Groups
químico	2	0.26	96, 72, 48, 24, 0
semibiol	2	0.56	72, 48, 24, 0
comercial	2	2	72, 48, 24, 0
144	2	2.12	72, 48, 24, 0
120	2	2.24	72, 48, 24, 0
96	2	2.92	químico, 72, 48, 24, 0
72	2	6.39	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 48, 24, 0
48	2	9.67	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 72, 24, 0
24	2	13.54	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 72, 48, 0
0	2	21.93	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 72, 48, 24

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Proteína, Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=10 MSE=0.557085 Critical Value=5.598423

Group	Count	Mean	Different From Groups
químico	2	0.26	72, 48, 24, 0
semibiol	2	0.56	72, 48, 24, 0
comercial	2	2	72, 48, 24, 0
144	2	2.12	72, 48, 24, 0
120	2	2.24	72, 48, 24, 0
96	2	2.92	72, 48, 24, 0
72	2	6.39	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 48, 24, 0
48	2	9.67	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 72, 24, 0
24	2	13.54	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 72, 48, 0
0	2	21.93	químico, semibiol, comercial, 144, 120, 96, 72, 48, 24

## Cenizas

## Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-4.6261	0.000004	Reject
Omnibus Normality of Residuals	21.4007	0.000023	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test			

## Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Temperatura	9	1051.111	116.7901	1986.23	0.000000*	1.000000
S(A)	10	0.588	0.0588			
Total (Adjusted)	19	1051.699				
Total	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

## Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: cenizas, Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=10 MSE=0.0588

Group	Count	Mean	Different From Groups
comercial	2	1.53	120, 144, 96, 72, 48, 24, 0
quimico	2	1.86	120, 144, 96, 72, 48, 24, 0
semibiol	2	1.92	120, 144, 96, 72, 48, 24, 0
120	2	6.03	comercial, quimico, semibiol, 72, 48, 24, 0
144	2	6.23	comercial, quimico, semibiol, 72, 48, 24, 0
96	2	6.42	comercial, quimico, semibiol, 72, 48, 24, 0
72	2	14.7	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 48, 24, 0
48	2	18.06	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 72, 24, 0
24	2	19.48	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 72, 48, 0
0	2	20.19	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 72, 48, 24

## Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: cenizas, Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=10 MSE=0.0588 Critical Value=5.598423

Group	Count	Mean	Different From Groups
comercial	2	1.53	120, 144, 96, 72, 48, 24, 0
quimico	2	1.86	120, 144, 96, 72, 48, 24, 0
semibiol	2	1.92	120, 144, 96, 72, 48, 24, 0
120	2	6.03	comercial, quimico, semibiol, 72, 48, 24, 0
144	2	6.23	comercial, quimico, semibiol, 72, 48, 24, 0
96	2	6.42	comercial, quimico, semibiol, 72, 48, 24, 0
72	2	14.7	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 48, 24, 0
48	2	18.06	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 72, 24, 0
24	2	19.48	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 72, 48
0	2	20.19	comercial, quimico, semibiol, 120, 144, 96, 72, 48

Análisis viscosidad**Tests of Assumptions Section**

<b>Assumption</b>	<b>Test Value</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Decision (0.05)</b>
Skewness Normality of Residuals	0.0000	1.000000	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-3.3209	0.000897	Reject
Omnibus Normality of Residuals	11.0286	0.004029	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test			

**Analysis of Variance Table**

<b>Source Term</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power (Alpha=0.05)</b>
A: Temperatura	8	7326726	915840.8	27.28	0.000020*	1.000000
S(A)	9	302172	33574.67			
Total (Adjusted)	17	7628898				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Duncan's Multiple-Comparison Test**

Response: viscosidad, Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=33574.67

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
comercial	2	2438	quimico, semibiol, 96, 144, 48, 72, 120, 24
quimico	2	2965	comercial, semibiol, 96, 144, 48, 72, 120, 24
semibiol	2	3758	comercial, quimico
96	2	4152	comercial, quimico
144	2	4192	comercial, quimico
48	2	4192	comercial, quimico
72	2	4203	comercial, quimico
120	2	4280	comercial, quimico
24	2	4345	comercial, quimico

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: viscosidad, Term A: Temperatura

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=33574.67 Critical Value=5.594751

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
comercial	2	2438	semibiol, 96, 144, 48, 72, 120, 24
quimico	2	2965	semibiol, 96, 144, 48, 72, 120, 24
semibiol	2	3758	comercial, quimico
96	2	4152	comercial, quimico
144	2	4192	comercial, quimico
48	2	4192	comercial, quimico
72	2	4203	comercial, quimico
120	2	4280	comercial, quimico
24	2	4345	comercial, quimico

---

# ARTICULOS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

---

## Congresos Nacionales:

Extracción de quitina a escala industrial mediante fermentación ácido láctica de desechos de camarón. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería, 21 – 26 junio, 2009. Acapulco Guerrero.

Efecto de la temperatura en la recuperación de quitina y astaxantina a partir de desechos de camarón utilizando bacterias ácido lácticas. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería, 21 – 26 junio, 2009. Acapulco Guerrero.

## Congresos internacionales:

Fermentación ácido láctica de desechos de camarón (*Litopenaeus vanameii*) para recuperación de quitina, y producción de quitosanos. Aceptado para presentar en el V Simposio Iberoamericano de Quitina, Santiago, Chile, 7-10 de Marzo de 2010.

Purificación parcial de quitina desacetilasas de *Colletotrichum gloeosporioides* y su acción en la desacetilación de quitinas. Aceptado para presentar en el V Simposio Iberoamericano de Quitina, Santiago, Chile, 7-10 de Marzo de 2010.

Application of chitosans and yeast as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. 10th International Chitin and Chitosan Conference, 7th European Chitin Society Conference, (2006) Montpellier Francia.

Efecto del quitosano en la producción de enzimas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo líquido y sólido. VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, VII congreso Nacional de Polímeros. Acapulco, México, Noviembre 2002.

### Publicaciones:

Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. Pacheco, Neith; Gárnica-González, Monica; Ramirez-Hernandez, Jessica; Flores-Albino, Belem; Gimeno, Miquel; Bárzana, Eduardo; Shirai, Keiko. *Bioresource Technology*. 100(2009) 2849-2854.

Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. Neith Pacheco, C. Patricia Larralde-Corona, Jose Sepulveda, Stéphan Trombotto, Alain Domard, Keiko Shirai. *Int J Biol Macromol*. 43(2008) 20-26.

Application of chitosans and yeast as growth inhibitors of *Penicillium digitatum* N. Pacheco, Patricia Larralde, M. Plasencia, A. Domard, K. Shirai.. 2007. *Advances in Chitin Science Volumen X*. A. Domard, E. Guibal, K. M. Vårum (eds.) Montpellier, Francia. 401-406 pp.